



**Joana Rita Curralo  
Mendes**

**PERFIL DA CITOLOGIA CERVICO-VAGINAL POR  
CITOMETRIA DE FLUXO**

**PROFILE OF CERVICOVAGINAL CYTOLOGY BY FLOW  
CYTOMETRY**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Dra. Rosete Maria Amorim Novais Nogueira Cardoso, Assistente Hospitalar Graduada de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho; e da co-orientação da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e CESAM.

## **o júri**

Presidente	Prof. Dra. Maria Lourdes Gomes Pereira professora associada com agregação, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro
Co-orientadora	Prof. Dra. Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos professora associada com agregação, Departamento Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro
Orientadora	Dra. Rosete Maria Amorim Novais Nogueira Cardoso assistente hospitalar graduada de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho
Arguente principal	Dr. Alberto Filipe Sansonetty Gonçalves Investigador, Escola das Ciências da Saúde, Universidade do Minho
Arguente	Dra. Helena Cristina Correia de Oliveira Investigadora Doutorada, CESAM, Universidade de Aveiro

“Quando mais aumenta o nosso conhecimento, mais evidente fica a nossa ignorância.”

John F. Kennedy

## **Agradecimentos**

No momento em que finalizo este trabalho desejo exprimir a minha gratidão a todos os que o tornaram possível. Dificilmente teria sido viável concretizá-lo sem a solidariedade e o estímulo intelectual que, de diferentes formas, me foi proporcionado por colegas, professores, amigos e familiares.

No entanto, existem pessoas às quais não posso deixar de particularizar esse reconhecimento, pois estiveram “demasiadamente” envolvidas neste percurso:

Aos meus pais, irmão e namorado, por TUDO!;

À Dra. Helena Oliveira pelo acompanhamento, disponibilidade, prontidão, paciência e cooperação;

Ao Alexandre Salvador (Enzifarma) pela pronta disponibilidade, ajuda material e indispensável colaboração;

À Dra. Conceição Santos pelo incentivo, insistência e acompanhamento;

À Dra. Rosete Nogueira pela confiança, apoio e cooperação;

Aos meus colegas e amigos: Cristina Matias, Estela Teixeira, Alice Alves, Goreti Pinto, Joana Silva, Filipe Matos e Armando Castro; pela amizade, toda a ajuda laboratorial e apoio moral;

À Dra. Sandra e à Dra. Susana (Centro de Histocompatibilidade do Norte), pela simpatia, disponibilidade e apoio laboratorial;

À Dra. Maria de Lourdes Pereira, pela disponibilidade;

À D. Maria Alice Azevedo, pela compreensão e facilidade de horários;

À Dra. Soledad Almeida (Hologic-Cytec) e à Dra. Laura Machado (Grupo Taper) pela cedência de material.

A todos: Muito obrigada!

## Palavras-chave

Citometria de fluxo, citologia cervico-vaginal, citologia em meio líquido, vírus do papiloma humano, perfis celulares.

## Resumo

O cancro do colo do útero é uma das neoplasias mais frequentes a nível mundial. A infecção persistente por Vírus do Papiloma Humano (HPV) de alto risco foi demonstrada como o principal factor de risco para o desenvolvimento desta neoplasia maligna.

Na luta contra o cancro, em particular o cancro do colo do útero, várias técnicas auxiliares de diagnóstico têm sido propostas para aumentar a precisão do rastreio citológico, nomeadamente a aplicação da citometria de fluxo (FCM). Esta é uma técnica objectiva, rápida e sensível, em que equipamentos mais avançados permitem, também, a separação física de citomas – separador celular activado por fluorescência (FACS).

O objectivo geral deste trabalho visou o estudo das potencialidades de FCM na análise de citologia cervico-vaginal (CCV) em meio líquido, dada a pouca informação disponível nesta área. Embora as técnicas de rastreio actualmente utilizadas sejam fiáveis e rápidas, a utilização da FCM pode apresentar-se como uma técnica complementar, com a utilização das suas potencialidades de análise multiparamétrica.

Neste estudo preliminar foram analisadas 54 amostras de CCVs fixados em meio líquido *PreservCyt (ThinPrep®)*, divididos em 7 grupos de diagnóstico citológico, segundo classificação de Bethesda 2001: negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (“NILM”), “NILM-Atrofia”; “NILM-Inflamação”; células pavimentosas atípicas de significado indeterminado (“ASC-US”); lesão intraepitelial de baixo grau (“LSIL”); lesão intraepitelial de alto grau (“HSIL”) e “Carcinoma epidermóide”. Os casos foram caracterizados, em FCM, relativamente à dispersão frontal e lateral da luz (FS e SS), intensidade de fluorescência com o marcador intercalar de DNA iodeto de propídio (IP), intensidade de marcação para o marcador específico CD45 e, ainda, procedeu-se à separação física de subpopulações por FACS.

Nestes resultados preliminares e na abordagem inicial de casos do grupo citológico de “NILM”, detectaram-se duas subpopulações distintas em FS vs SS. Este perfil foi o predominante, contudo, variou em alguns dos grupos citológicos. Por exemplo, nos grupos “NILM-Atrofia” e “Carcinoma epidermóide” verificou-se uma distribuição dos eventos em “arrasto”, não permitindo uma distinção clara de subpopulações. A metodologia aplicada, segundo a sequência de: análise da dispersão da luz, marcação com IP, marcação com CD45 e FACS; mostrou-se até ao momento inconclusiva dado que, no final, as células das duas subpopulações mostraram ser do mesmo tipo celular (células pavimentosas). Por outro lado, embora não se tenha até ao momento estabelecido uma correlação entre as subpopulações obtidas por FCM e os grupos citológicos, o perfil de arrasto descrito pode dar informação sobre um possível diagnóstico citológico de “NILM-Atrofia”.

**Resumo (continuação)**

Em função destes resultados inconclusivos e da literatura existente, está em curso um estudo mais alargado em termos de amostragem em meio líquido (e.g. diferentes meios/condições de preservação e diferentes anticorpos), no sentido de compreender os resultados obtidos em FCM e FACS, e explorar esta técnica como auxiliar de diagnóstico no rastreio do cancro do colo do útero.

## Keywords

Flow cytometry, cervicovaginal cytology, liquid-based cytology, human papillomavirus, cell profile.

## Abstract

Cervical cancer is one of the most common cancers worldwide. Persistent high risk human papillomavirus (HPV) infection has been demonstrated as the main cause of cervical cancer.

In the fight against cancer, in particular cervical cancer, various auxiliary diagnostic techniques have been proposed to increase the accuracy of cytologic screening, including the application of flow cytometry (FCM). This is an objective, rapid and sensitive technique, which is possible in more advanced equipment, also, the physical separation of cytomas - by fluorescence activated cell sorter (FACS).

The general aim of this work was to study the potential of FCM analysis of the cervicovaginal cytology (CCV) in liquid-based, given the little information available in this area. Although the screening techniques currently used are reliable and fast, the use of FCM can be presented as a complementary technique, taking advantage of its potential for multiparametric analysis.

In this preliminary study were analysed 54 samples of CCVs fixed in a based-liquid *PreservCyt (ThinPrep®)*, divided into 7 groups of cytological diagnosis, according to Bethesda 2001 classification: negative for intraepithelial lesion or malignancy ("NILM"), "NILM-Atrophy"; "NILM-Inflammation"; atypical squamous cells of undetermined significance ("ASC-US"), low-grade squamous intraepithelial lesion ("LSIL"), high-grade squamous intraepithelial lesion ("HSIL") and "Squamous cell carcinoma". The cases were characterized, by FCM, for forward and side scatter (FS and SS), fluorescence intensity with the DNA intermediate marker propidium iodide (PI) and the leucocyte specific marker CD45, and also proceeded to the physical separation of populations by FACS.

In these preliminary results and in the initial approach about cases of the cytological group "NILM", there were two distinct subpopulations in FS vs SS. This profile was predominant, however, varied in some of the cytological groups. For example, in the groups "NILM-Atrophy" and "Squamous cell carcinoma" there was a distribution of events in drag, not allowing a clear distinction of subpopulations. The applied methodology, according to the following: review of light scatter, IP marking, CD45 marking and FACS; proved inconclusive so far because, in the end, the cells of both subpopulations were shown to be of the same cell type (squamous cells). Moreover, although we have not so far established a correlation between subpopulations obtained by FCM and cytological groups, the drag profile described can give information about a possible cytological diagnosis of "NILM-Atrophy".

In light of these inconclusive results and the existing literature, is an ongoing larger study in terms of sampling in based-liquid (e.g. different based-liquids/ conditions of preservation and different antibodies), in order to understand the results obtained in FCM and FACS, and explore this technique as a auxiliar of diagnostic in the screening of cervical cancer.

## ÍNDICE GERAL

	Página
Resumo . . . . .	v
Abstract . . . . .	vi
Índice Geral . . . . .	vii
Índice de Figuras . . . . .	ix
Índice de Tabelas . . . . .	xiii
Lista de Abreviaturas . . . . .	xiv

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL . . . . .</b>	<b>1</b>
Cancro do Colo do Útero . . . . .	3
O Vírus do Papiloma Humano e o Cancro . . . . .	4
Rastreio, Prevenção e Vacinação . . . . .	8
Classificação de Bethesda 2001 . . . . .	10
Biologia Molecular do Cancro . . . . .	11
Citometria de Fluxo . . . . .	15
Citometria de Fluxo e Citologia Cervico-Vaginal – Análise das células epiteliais do colo do útero . . . . .	17
Separador Celular Activado por Fluorescência – “Sorter” . . . . .	18
Objectivos . . . . .	20
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .</b>	<b>21</b>
Amostragem . . . . .	23
Análise e Captação de Imagens por Microscopia Óptica . . . . .	23
Análise por Citometria de Fluxo . . . . .	25



* Análise de dispersão de luz e de fluorescência por marcação com iodeto de propídio . . . . .	25
* Análise segundo marcação por CD45 e iodeto de propídio . . . . .	26
Análise e Captação de Imagens por Microscopia de Fluorescência . . . . .	27
Análise por FACS . . . . .	27
Considerações Éticas . . . . .	27
<b>3. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>29</b>
Perfis Citológicos observados em cada Grupo Analisado . . . . .	31
* NILM . . . . .	31
- Subpopulações celulares de CCV em meio líquido, por FCM e FACS – dispersão de luz, marcação por iodeto de propídio e marcação por CD45 . . . . .	36
- Citometria de fluxo vs tempo de fixação . . . . .	38
* NILM-Atrofia . . . . .	40
* NILM-Inflamação . . . . .	43
* ASC-US . . . . .	46
* LSIL . . . . .	48
* HSIL . . . . .	50
* Carcinoma epidermóide . . . . .	52
<b>4. DISCUSSÃO . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS . . . . .</b>	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .</b>	<b>69</b>
<b>7. ANEXOS . . . . .</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> – Taxa de incidência mundial do cancro do colo do útero, por 100 000 habitantes, em 2002 . . . . .	3
<b>Figura 2</b> – Modelo etiológico da infecção por HPV e cancro do colo do útero, ilustrando o papel das infecções persistentes e dos co-factores na mediação da progressão das lesões . . . . .	5
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática do genoma do HPV, com os genes precoces ( <i>E1</i> , <i>E2</i> , <i>E4</i> , <i>E5</i> , <i>E6</i> e <i>E7</i> ), os genes tardios ( <i>L1</i> e <i>L2</i> ) e a região reguladora (URR) . . . . .	6
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da evolução de células normais para células anómalas e para uma situação de cancro do colo do útero . . . . .	7
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática da acção das oncoproteínas <i>E6</i> e <i>E7</i> e sua relação com o ciclo celular. A <i>E6</i> e <i>E7</i> ligam-se às proteínas celulares p53 e pRb respectivamente, alterando as suas funções e as vias de regulação do ciclo celular . . . . .	12
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática do mecanismo de infecção do HPV no colo do útero, mostrando o epitélio pavimentoso estratificado e a expressão de proteínas virais durante a infecção: após a infecção das células da camada basal por HPV, ocorre a produção de proteínas virais não estruturais. Sob a regulação destas proteínas, as células em divisão sofrem expansão vertical e a diferenciação epitelial é atrasada. As proteínas virais são expressas sequencialmente ao longo da diferenciação e são libertados viriões maduros nas camadas superficiais do epitélio . . . . .	13
<b>Figura 7</b> – Modelo esquemático de um citómetro de fluxo, assinalando os principais componentes . . . . .	15
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual dos citomas é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina ( <i>sheat fluid</i> ) . . . . .	16
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática de um FACS, com base em métodos electrostáticos . . . . .	19

**Figura 10** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM” (PAP). Na imagem observa-se citologia de fundo limpo com células pavimentosas normais (seta branca) . . . . . 31

**Figura 11** – Representações gráficas de um caso “NILM”. (I) Diagrama biparamétrico FS log vs SS log mostrando duas subpopulações distintas (A e B). (II) Histograma da fluorescência do iodeto de propídio - FL3:IP das duas subpopulações. (III) Histograma da fluorescência do iodeto de propídio - FL3:IP da subpopulação A. (IV) Histograma da fluorescência do iodeto de propídio - FL3:IP da subpopulação B . . . . . 32

**Figura 12** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 13 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “NILM” . . . . . 35

**Figura 13** – (I) Diagrama biparamétrico FS log vs SS log demonstrando as duas subpopulações encontradas (A e B) na CCV em meio líquido, através da análise por FCM. (II) Histograma da fluorescência do CD45 - FL1:CD45, mostrando a marcação da subpopulação A e B: a subpopulação A apresenta forte marcação e a subpopulação B fraca marcação. (III a e b) Histogramas da fluorescência do IP - FL3:IP, com a representação do conteúdo de DNA nuclear de cada uma das subpopulações A (III b) e B (III a). (IV a b e c) Imagens de microscopia óptica (PAP), das células obtidas por FACS após separação da subpopulação A (IV c) e B (IV b), segundo o diagrama biparamétrico FSC-H vs SSC-A apresentado (IV a). As células observadas em ambas as imagens de microscopia óptica são células epiteliais, do tipo pavimentoso (seta branca) . . . . . 37

**Figura 14** – Imagens de microscopia de fluorescência, de células do colo do útero, com marcação por IP. (A) Maioritariamente células epiteliais pavimentosas (seta branca). (B) Ao centro, célula leucocitária do tipo polimorfonuclear neutrófilo (seta amarela) . . . . . 38

**Figura 15** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do iodeto de propídio de um mesmo caso de CCV em meio líquido analisado por FCM e em diferentes períodos de tempo, variando, deste modo, o tempo de fixação (A) Após 3 semanas. (B) Após 6 semanas. (C) Após 7 semanas. (D) Após 8 semanas. (E) Após 9 semanas de fixação . . . . . 39

**Figura 16** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM-Atrofia” (PAP). Na imagem observam-se células parabasais (seta branca), células pavimentosas (seta amarela) e PMNs (seta vermelha) . . . . . 40

**Figura 17** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 16 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “NILM-Atrofia” . . . . . 42

**Figura 18** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM-Inflamação” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas (seta branca), abundantes PMNs (seta amarela) e alterações reactivas à inflamação – vacuolização citoplasmática (seta vermelha) . . . . . 43

**Figura 19** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 10 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “NILM-Inflamação” . . . . . 45

**Figura 20** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM-Inflamação” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas normais (seta branca) e células pavimentosas atípicas com aumento nuclear, hiper cromasia nuclear e queratinização do citoplasma (seta amarela) . . . . . 46

**Figura 21** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 4 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “ASC-US” . . . . . 47

**Figura 22** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “LSIL” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas com acentuado aumento nuclear, aumento da N/C e hiper cromasia nuclear (seta branca) e um coilócito (seta amarela) . . . . . 48

**Figura 23** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 5 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “LSIL” . . . . . 49

**Figura 24** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “HSIL” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas normais (seta branca), PMNs (seta amarela) e um grupo de células pavimentosas com acentuado aumento da N/C, perda de citoplasma, acentuada hiper cromasia nuclear e membrana nuclear irregular (seta vermelha) . . . . . 50

**Figura 25** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 4 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “HSIL” . . . . . 51

**Figura 26** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “Carcinoma epidermóide” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas fusiformes, pleomórficas, com acentuada aumento e hipercromasia nuclear, com citoplasma denso e oranjófilo (seta branca). Observa-se também diátese tumoral (seta amarela) . . . . . 52

**Figura 27** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 2 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “Carcinoma epidermóide” . . . . . 53

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> – Sistema de Bethesda 2001 – Versão portuguesa . . .	10

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAHS</b>	Sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIS</b>	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ASC-H</b>	Células pavimentosas atípicas – não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau
<b>ASC-US</b>	Células pavimentosas atípicas de significado indeterminado
<b>ASO4</b>	Monofosforil lípido A
<b>CCV</b>	Citologia cervico-vaginal
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CIN</b>	Neoplasia intraepitelial cervical
<b>FCM</b>	Citometria de fluxo
<b>CV</b>	Coeficiente de variação
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-phenylindole
<b>DIU</b>	Dispositivo intra-uterino
<b>DST</b>	Doença sexualmente transmissível
<b>e.g.</b>	<i>Exempli gratia</i>
<b>FACS</b>	Separador celular ativado por fluorescência ( <i>Fluorescence activated cell sorting</i> )
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FL</b>	Fluorescência
<b>FS</b>	Dispersão frontal ( <i>Forward Scatter</i> )
<b>HLA</b>	Antigénio leucocitário humano
<b>HPV</b>	Vírus do papiloma humano
<b>HSIL</b>	Lesão intraepitelial de alto grau
<b>IP</b>	Iodeto de propídio
<b>log</b>	Logaritmo
<b>LSIL</b>	Lesão intraepitelial de baixo grau
<b>MF</b>	Microscopia de fluorescência
<b>MO</b>	Microscopia óptica
<b>NILM</b>	Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade

<b>N/C</b>	Relação núcleo-citoplasma
<b>Nº</b>	Número
<b>ORF</b>	Fase aberta de leitura
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PMN</b>	Polimorfonuclear neutrófilo
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SIDA</b>	Síndrome de imunodeficiência adquirida
<b>SIL</b>	Lesão pavimentosa intraepitelial
<b>SOE</b>	Sem outra especificação
<b>spp</b>	Espécie
<b>SS</b>	Dispersão ortogonal ou lateral ( <i>Side Scatter</i> )
<b>URR</b>	Região regulatória a montante
<b>VLP</b>	Partículas do tipo-vírus
<b>vs</b>	<i>Versus</i>



*“Harald zur Hausen lutou contra o dogma e postulou que o HPV pode causar o cancro do colo do útero, o segundo mais comum entre as mulheres. Ele percebeu que o DNA do HPV pode existir num estado não-produtivo e que pode ser detectado por buscas específicas ao DNA viral. Ele descobriu que o HPV é uma família heterogénea de vírus. Apenas alguns tipos de HPV causam o cancro. A sua descoberta levou à caracterização da história natural da infecção pelo HPV, a uma compreensão dos mecanismos de formação do carcinoma induzido pelo HPV e ao desenvolvimento de vacinas profiláticas contra a infecção pelo HPV”.*  
Comité Nobel, 2008

*"No início, não foi fácil divulgar minhas pesquisas, mas graças a Deus elas se confirmaram como correctas. Entre 1972 e 1982, meus trabalhos foram vistos com muito cepticismo".*  
Harald zur Hausen, 2008

---

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

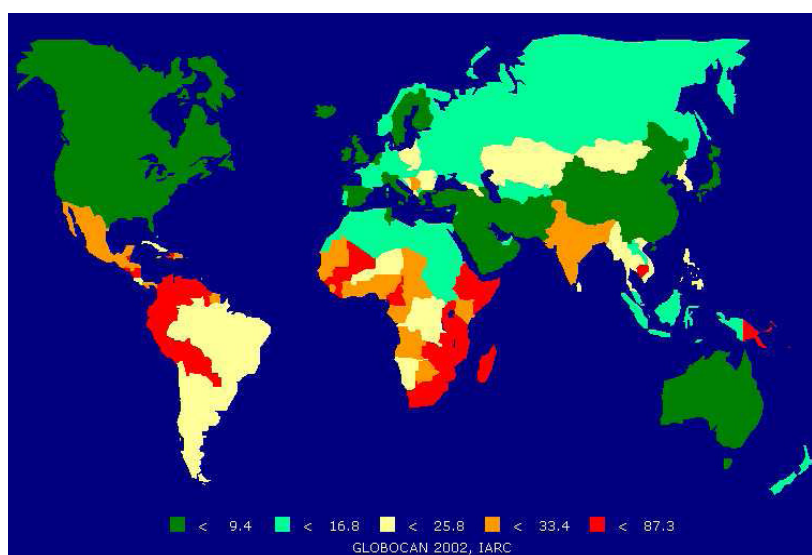
---



## CANCRO DO COLO DO ÚTERO

O cancro é actualmente uma das principais causas de morte em Portugal e, seguramente uma das situações com maior impacto na saúde pública, ao nível da prestação de cuidados hospitalares e de incapacidade. Nestas condições, a doença oncológica tornou-se uma das prioridades das políticas de saúde em Portugal. As doenças oncológicas têm sido vistas como a grande epidemia dos últimos anos. Por um lado pela elevada morbilidade e elevadas taxas de mortalidade, e por outro, pelo gradual aumento da sua incidência. A isto não será, porventura, alheio o envelhecimento da população, a melhoria dos métodos de diagnóstico e mesmo o aumento da eficácia do tratamento<sup>1</sup>.

Em todo o mundo o cancro do colo do útero, também designado por carcinoma cervical, é o 2º cancro mais frequente no sexo feminino e representa cerca de 10% de todos os cancros na mulher. Em 2002 foram diagnosticados 493.000 novos casos de cancro cervical invasivo, dos quais 83% foram diagnosticados em países subdesenvolvidos<sup>2,3</sup>, onde não se aplicam programas de rastreio (Figura 1).



**Figura 1** – Taxa de incidência mundial do cancro do colo do útero, por 100.000 habitantes, em 2002 (adaptado de *International Agency for Research on Cancer*<sup>3</sup>).

Na Europa, o cancro do colo do útero sucede ao cancro da mama e ao cancro colo-rectal como a terceira causa de morte por cancro nas mulheres<sup>4,5</sup>. Dados de 2006, estimam que, nesse ano, 46.600 mulheres morram na Europa vítimas deste cancro<sup>5</sup>, constituindo um importante problema de saúde pública. Ao longo dos últimos anos, o

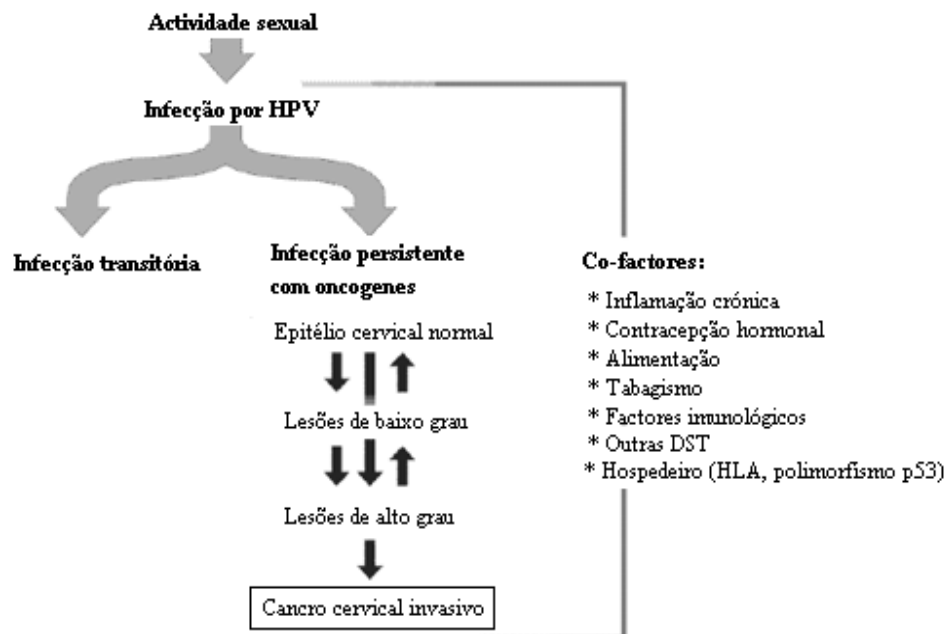
número de casos tem vindo a diminuir, graças aos programas de prevenção, designadamente ao rastreio<sup>5-8</sup>. Em Portugal, no ano 2002, foram diagnosticados 956 novos casos e 378 óbitos, o que correspondeu a uma taxa de incidência de 13,5/100.000 e a uma taxa de mortalidade de 4,5/100.000, o valor mais elevado da Europa Ocidental<sup>9</sup>. Os dados disponíveis apontam para dois grandes picos de incidência no nosso país, ocorrendo entre os 40-45 anos e entre os 55-65 anos<sup>10</sup>.

## **O VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO E O CANCRO**

Há mais de cento e cinquenta anos que se reconhece que as doenças sexualmente transmissíveis (DST), os cancros cervicogenitais e a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) estão, entre outros factores, relacionados com os estilos de vida e as práticas sexuais<sup>10</sup>. A infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) tem sido muito investigada pela sua relação com o desenvolvimento do cancro do colo do útero. Vários estudos têm demonstrado que o HPV é um factor etiológico necessário para o desenvolvimento desta neoplasia, embora não seja suficiente<sup>10,11</sup>. Esta ligação (HPV e cancro) foi pela primeira vez demonstrada, no início dos anos 80, por Harald zur Hausen, um virologista alemão<sup>12</sup>, cuja descoberta lhe valeu a atribuição do prémio Nobel da Medicina em 2008. Algumas das dificuldades na identificação do HPV e sua ligação com o cancro do colo do útero, prendem-se com o facto de não ter sido ainda possível cultivar este vírus *in vitro*. Até aos anos 70 do século passado, o vírus Herpes era apontado como a principal causa para esta enfermidade. Contudo, em 1972, por estudos de Biologia Molecular não foi possível detectar a presença do vírus Herpes em amostras de células tumorais obtidas do colo do útero. Este resultado negativo abriu perspectivas para a investigação noutras direcções e potenciou estudos de detecção do HPV em amostras de células tumorais, através da presença de sequências genéticas deste vírus, nessas amostras. Desde então, o grupo de Zur Hausen identificou em 1983 a presença de HPV 16 (um dos HPVs oncogénicos) em lesões pré-neoplásicas, e em 1985 caracterizou a organização genética e a actividade do DNA do HPV nas células tumorais do colo do útero<sup>12</sup>.

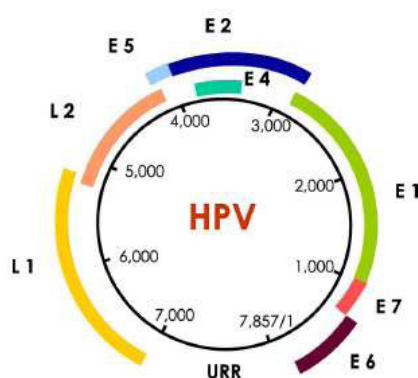
Segundo a Sociedade Portuguesa de Papillomavírus<sup>11</sup>, a infecção por HPV, por si só, não leva ao desenvolvimento de cancro, no entanto, 99,7% das mulheres com cancro do colo do útero estão infectadas por estirpes de HPV de alto risco<sup>9</sup>. Os estudos revelam também que a infecção é mais comum em jovens sexualmente activos (entre 16 e 25

anos) e que o risco aumenta com o número de parceiros sexuais. Como já foi referido, a infecção é considerada necessária mas não suficiente para o desenvolvimento desta neoplasia maligna, estando descritos co-factores para a evolução da infecção, dos quais se destacam a inflamação crónica, contracepção hormonal, alimentação, raça, tabagismo, álcool, factores imunológicos e outros agentes infecciosos responsáveis por DST, como por exemplo o *Herpesvirus 2* e a *Chlamydia Trachomatis*<sup>9,11,13</sup>. Factores genéticos como haplótipos HLA específicos e polimorfismos em alguns genes envolvidos na regulação do ciclo celular e reparação do DNA têm sido também associados ao desenvolvimento desta neoplasia<sup>14</sup> (Figura 2).



**Figura 2** – Modelo etiológico da infecção por HPV e cancro do colo do útero, ilustrando o papel das infecções persistentes e dos co-factores na mediação da progressão das lesões (adaptado de Franco *et al*<sup>15</sup>).

O HPV é facilmente transmissível e a sua infecção pode ser totalmente silenciosa. É um vírus de DNA circular de cadeia dupla, com cerca de 8.000 pares de bases (pb) e é constituído por 8 fases abertas de leitura (ORF) que correspondem às sequências delimitadas entre um codão de “iniciação” e um codão “stop”<sup>16</sup> (Figura 3). A sua expressão está intimamente dependente do programa de diferenciação da célula hospedeira, de modo que, a nível funcional, o genoma divide-se numa região precoce e numa região tardia, de acordo com o momento em que os respectivos genes são transcritos, durante o ciclo viral<sup>17</sup>.

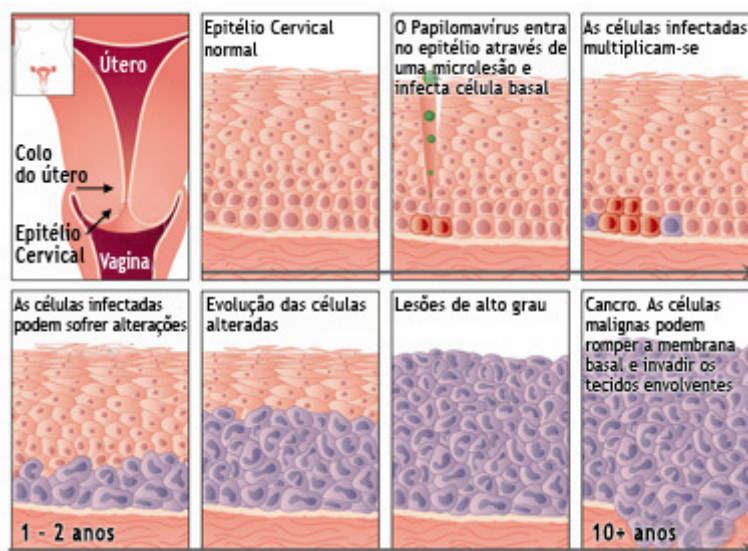


**Figura 3** – Representação esquemática do genoma do HPV, com os genes precoces (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*), os genes tardios (*L1* e *L2*) e a região reguladora (URR) (retirado de Silva<sup>17</sup>).

Os genes precoces (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*) são expressos nas células das camadas inferiores do epitélio do colo do útero e codificam as proteínas necessárias para a replicação e transcrição do genoma viral. Os genes tardios (*L1* e *L2*) codificam proteínas estruturais, com capacidade para se auto-agregarem, de modo a formar a cápside do vírus, constituída maioritariamente pela proteína viral *L1*, que contribui com cerca de 80-90% do conteúdo proteico, e, em menor proporção, pela *L2*<sup>16,17</sup>.

A montante das ORF, existe uma região reguladora (URR) não codificante (Figura 3), de aproximadamente 1.000 pb. Esta região contém as sequências que regulam a expressão dos genes virais, nomeadamente o promotor, contendo locais de ligação para as polimerases do DNA e do RNA, e outros factores que potenciam ou reprimem a expressão dos genes virais<sup>16,17</sup>.

Este vírus pertence à família dos *Papoviridae* e estão já identificados cerca de 200 genótipos de HPVs diferentes, dos quais cerca de 40 infectam preferencialmente os genitais: vulva, vagina, colo, pénis e áreas perianais<sup>9,11,16</sup>. Apesar da sua elevada taxa de infecção, na maioria dos casos é transitória e auto-limitada, tendo resolução espontânea em 80% dos casos, ao fim de 1-2 anos<sup>9</sup>. A infecção torna-se persistente nos restantes 20%, condição predisponente a uma evolução desfavorável. Mas, mesmo assim, muitos destes casos não evoluem para neoplasia. Estima-se que apenas 3 a 4 % dos casos de infecção evoluem para neoplasia intraepitelial, dos quais 0,7 a 1% para neoplasia intraepitelial cervical (CIN) II-III (verdadeira lesão pré-cancerosa) e 0,1% para cancro invasivo, com um tempo de progressão variável, em geral, à volta dos 15 anos<sup>9</sup> (Figura 4).



**Figura 4** – Representação esquemática da evolução de células normais para células anómalas e para uma situação de cancro do colo do útero (retirado de Liga Portuguesa contra o Cancro<sup>18</sup>).

A origem vírica do cancro cervical está solidamente estabelecida, para a esmagadora maioria dos casos. Diversos estudos mostraram que o DNA do HPV pode ser encontrado em 99,7% dos cancros cervicais (pavimentosos e adenocarcinomas)<sup>9,16</sup>, sendo os tipos 16, 18, 31 e 45 os encontrados com maior frequência. Baseados nestas observações, os HPVs anogenitais foram divididos em dois grupos: o primeiro, associado ao desenvolvimento de cancro cervical, foi denominado de alto risco (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) e o segundo associado a lesões benignas, com baixo potencial oncogénico, denominado HPV de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81)<sup>9</sup>.

A transmissão deste vírus é feita por contacto genital (pele a pele), pelo que cerca de 75% das mulheres sexualmente activas se deparam com este vírus, pelo menos uma vez, ao longo das suas vidas<sup>11</sup>. Qualquer pessoa que tenha tido alguma forma de contacto genital com um portador de HPV genital pode estar infectada, ou seja, não é necessário ter relações sexuais para haver infecção. Por outro lado, mesmo que se tenha um único parceiro, se este for portador de HPV pode ser suficiente para que ocorra essa mesma infecção<sup>18</sup>.

O facto de muitas vezes a infecção pelo HPV não ocasionar o desenvolvimento de sinais e/ou sintomas, pode levar a que muitas mulheres ignorem que estão infectadas. É, por isso, importante que as mulheres façam regularmente exame ginecológico e citologia cervico-vaginal (CCV), esta última também conhecida pelo “teste de Papanicolaou”. Este



teste permite a detecção de anomalias nas células do colo do útero. Deste modo, muitos casos de lesões pré-cancerosas do colo uterino podem ser tratadas com êxito quando detectadas prematuramente<sup>18</sup>.

## **RASTREIO, PREVENÇÃO E VACINAÇÃO**

O rastreio é essencial para a detecção de células anómalas associadas ao HPV, contudo, não protege contra as doenças relacionadas com este vírus (prevenção secundária). Dentro das várias medidas de prevenção, o uso do preservativo é incentivado, pois pode reduzir globalmente o número de casos de infecção por vírus e bactérias, apesar de não proteger completamente contra a transmissão do HPV, uma vez que este pode estar na pele que não é coberta pelo preservativo<sup>11</sup>.

Para prevenção primária deste tipo de cancro e de lesões pré-malignas foram desenvolvidas vacinas. Com efeito, em 2006 foi aprovada, nos EUA e na Europa<sup>9</sup>, a vacina quadrivalente (Gardasil®), constituída por partículas tipo-vírus (VLP) do HPV 6, 11, 16 e 18. Para além desta vacina quadrivalente existe também uma bivalente (VLPs do HPV 16 e 18). Ambas as vacinas são geradas por tecnologias recombinantes e são compostas por VLPs. As VLPs são produzidas clonando os principais genes da cápside viral (L1) de diferentes tipos de HPV e inseridas em vectores (baculovírus – vacina bivalente e levedura – vacina quadrivalente). Estas VLPs têm grande semelhança com os viriões do HPV, não contendo, no entanto, material genético, pelo que não são infecciosas nem oncogénicas. Induzem níveis elevados de anticorpos neutralizantes quando administradas por via intramuscular, com rápido acesso das VLPs aos vasos sanguíneos e gânglios linfáticos. São, por outro lado, potentes activadoras das células apresentadoras de antígeno. As VLPs purificadas são misturadas com o adjuvante hidróxido de alumínio + MPL monofosforil lípido A (ASO4) na vacina bivalente e com o sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo (AAHS) na vacina quadrivalente<sup>6</sup>.

A vacinação contra o HPV reduz o risco de cancro do colo do útero, mas não o elimina, já que nem todos os tipos de HPV estão incluídos na vacinação. Prevalece, assim, a importância de realizar um rastreio regular recorrendo à CCV<sup>9,11,18,19</sup>. Desde a sua introdução há mais de 50 anos, este rastreio populacional do colo do útero pela CCV foi o grande contribuidor para o declínio na taxa deste cancro, reduzindo a sua incidência e mortalidade em aproximadamente 85%<sup>20</sup>. A sua eficácia e eficiência têm sido amplamente demonstradas em regiões onde foi aplicado de forma programada,

sistemática e continuada<sup>19</sup>, como é o caso do programa de rastreio da região centro do nosso país<sup>9</sup>. Para além da citologia convencional (esfregaço feito directamente na lâmina), surgiu nos anos 90, a citologia em meio líquido ou camada fina. Esta última oferece uma série de vantagens sobre a primeira, especialmente por melhorar a leitura dos esfregaços eliminando o sangue e outros artefactos. Permite também, apenas com uma simples colheita de células, a repetição dos esfregaços e a realização de outras técnicas de diagnóstico, como os testes ao HPV, à *Clamydia* e à Gonorreia. A adopção deste tipo de citologia melhorou também (e muito) a sensibilidade da CCV, passando de 20 a 76% (na citologia convencional) para 84% na citologia em meio líquido<sup>21</sup>. Várias empresas desenvolveram este método em meio líquido, tendo sido nos Estados Unidos aprovados o *ThinPrep*<sup>®</sup>, o *MonoPrep*<sup>®</sup> e o *SurePath*<sup>™</sup>; sendo o *ThinPrep*<sup>®</sup> aprovado pelo FDA, em 1996, como “significativamente mais efectivo” que o método convencional<sup>21</sup>.

O teste para detecção de DNA do HPV tem sido referido em numerosos trabalhos, também como teste de rastreio<sup>19</sup>. As suas características fazem com que seja um teste de aplicação útil quando associado à citologia ou mesmo como teste inicial e isolado no rastreio, em mulheres com mais de 30 anos. É, também, aplicado na investigação de determinadas situações de CCVs anormais. Estas análises até há pouco tempo estavam restritas a centros especializados e com pessoal treinado. A progressiva implantação desta tecnologia colocou à disposição dos clínicos métodos fiáveis, reproduzíveis e disponíveis comercialmente, como a captura híbrida, que embora não tenha a sensibilidade do PCR, apresenta bons resultados<sup>19</sup>. Independentemente do método utilizado, todas as técnicas se baseiam na especificidade da complementaridade entre os ácidos nucleicos. Uma sequência de DNA tem a capacidade de hibridar especificamente com outros DNAs e RNAs de modo tão específico que requer 100% de complementaridade das bases para a uma determinada temperatura se formarem híbridos. O modo de detecção destes híbridos, a composição das sondas de DNA e a existência ou não de amplificação de sinal marcam as diferenças entre diversas técnicas. Os diversos subtipos de DNA viral podem ser avaliados separadamente, mas para baixar custos determina-se a presença do DNA por grupos de risco mais comuns: baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) e alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 45, 51, 56, 58, 59 e 68). Atendendo que o potencial oncológico significativo só é induzido pela presença do HPV de alto risco, na prática clínica, para o rastreio, diagnóstico ou seguimento das doentes só tem interesse avaliar a presença do HPV de alto risco<sup>19</sup>.

## CLASSIFICAÇÃO DE BETHESDA 2001

Actualmente e desde 1988 (ano da sua criação), o Sistema de Bethesda é a classificação mais utilizada para a avaliação da CCV. Este Sistema impôs-se à já existente classificação de Papanicolaou, pela clareza da terminologia utilizada, pela uniformidade e razoável reprodutibilidade entre diferentes citotécnicos, patologistas e laboratórios; e reflete uma compreensão mais actual da neoplasia cervical<sup>22</sup>. A sua última actualização aconteceu em 2001 e encontra-se esquematizada na Tabela 1.

**Tabela 1** – Sistema de Bethesda 2001 – Versão portuguesa (adaptada de Sociedade Portuguesa de Citologia<sup>23</sup>).

<b>BETHESDA 2001 – Versão portuguesa</b>	
<b>* TIPO DE AMOSTRA</b>	
Convencional vs Meio líquido	
<b>* AVALIAÇÃO DA AMOSTRA</b>	
<b>Satisfatória</b>	
Com representação da zona de transformação	Sem representação da zona de transformação
Parcialmente obscurecida por inflamação	Parcialmente obscurecida por sangue
Artefactos de fixação	Outros.....
<b>Não satisfatória</b>	
Rejeitada/não processada por.....	
Processada e examinada, mas não satisfatória por.....	
<b>* CATEGORIA GLOBAL</b>	
<b>NEGATIVA PARA LESÃO INTRAEPITELIAL OU MALIGNIDADE</b>	
	Ver interpretação <input type="checkbox"/>
<b>ANOMALIAS DE CÉLULAS EPITELIAIS, pavimentosas/glandulares</b>	
	Ver interpretação <input type="checkbox"/>
<b>OUTRA NEOPLASIA MALIGNA</b>	
	Ver interpretação <input type="checkbox"/>
<b>AUSÊNCIA DE LESÃO INTRAEPITELIAL, MAS COM PRESENÇA DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS, a valorizar pela clínica*</b>	
<i>* Comentário opcional: depois dos 40 anos pode estar associada a endométrio sem patologia, alterações hormonais ou menos frequentemente a patologia endometrial/uterina.</i>	
<b><u>INTERPRETAÇÃO</u></b>	
<b>Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM)</b>	

**Alterações celulares reactivas associadas a:**

- Inflamação, radiação, DIU, paraqueratose/hiperqueratose ou outras

**Microorganismos**

- *Trichomonas vaginalis*
- Fungos com morfologia compatível com spp *Candida*
- Desvio da flora vaginal sugestivo de vaginose bacteriana
- Bactérias com morfologia compatível com spp *Actinomyces*
- Alterações celulares associadas com o vírus *Herpes simplex*

**Atrofia**

**Células glandulares benignas pós-histerectomia**

**Anomalias de células epiteliais pavimentosas**

**Células pavimentosas atípicas**

- de significado indeterminado – **ASC-US**
- não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau – **ASC-H**

**Lesão intraepitelial de baixo grau – LSIL**

**Lesão intraepitelial de alto grau – HSIL**

- Não se pode excluir invasão

**Carcinoma epidermóide**

**Anomalias de células glandulares**

**Células atípicas** (endocervicais, endometriais ou sem outras especificações (SOE))

**Células atípicas, sugestivas de neoplasia** (endocervicais ou SOE)

**Provável adenocarcinoma *in situ* (AIS) do endocolo**

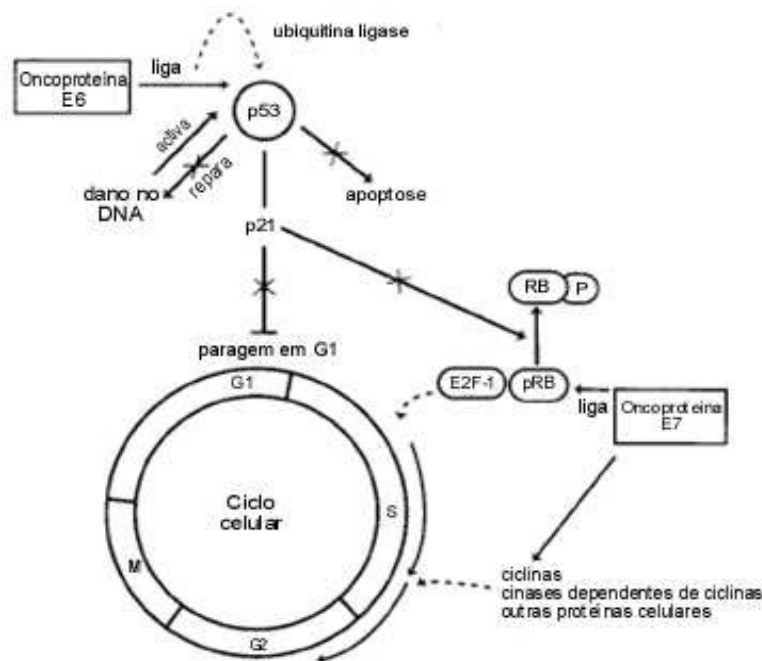
**Adenocarcinoma** (SOE ou do tipo endocervical, endometrial ou extrauterino)

**Outra neoplasia maligna:** especificar

## BIOLOGIA MOLECULAR DO CANCRO

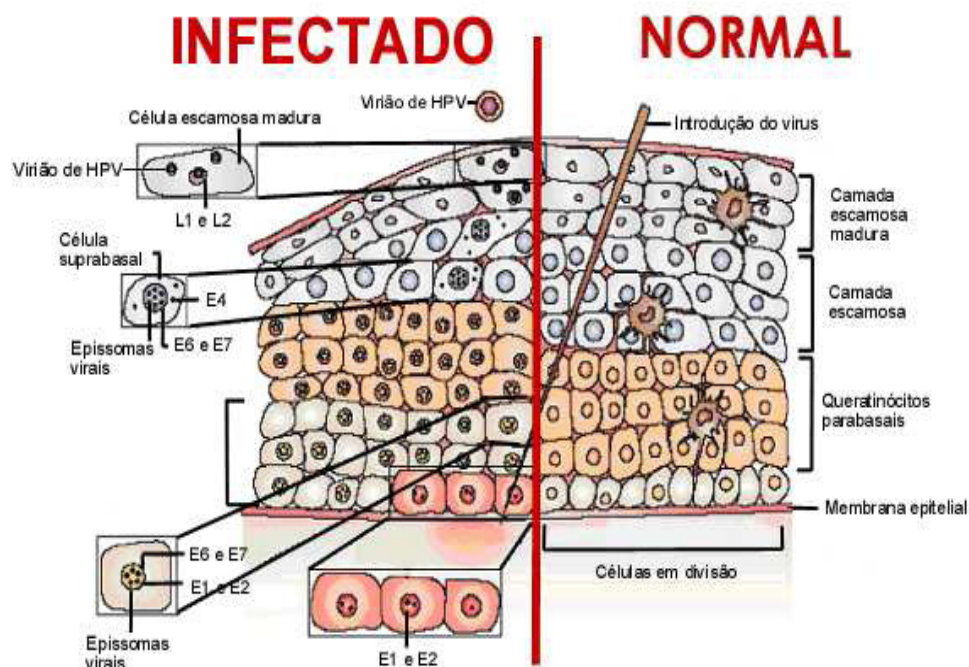
A forte associação entre a infecção precoce por HPV e o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas ou carcinoma evidente é amplamente aceite<sup>24,25</sup>. A carcinogénese deste tipo de tumor desenvolve-se com a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro, envolvendo a linearização do genoma do vírus entre os genes *E1* e *L1*, e a inactivação do gene *E2* por corte ou deleção aquando da integração. Este gene (*E2*) codifica uma proteína homónima responsável pela regulação da expressão dos genes *E6* e *E7*, pelo que a sua perda induz a expressão descontrolada destes genes, produzindo

alterações fenotípicas na célula hospedeira<sup>11</sup>. Os genes virais *E6* e *E7* codificam proteínas responsáveis pelo potencial oncogénico do vírus. A proteína *E6* dos HPVs de alto risco liga-se à proteína celular supressora de tumor – p53, e leva à sua rápida degradação. Como consequência, as actividades normais da p53 como a indução de paragem do ciclo celular em G1, apoptose e reparação do DNA, não são realizadas. Deste modo, e uma vez que a p53 regula os *checkpoints* G1/S e G2/M do ciclo celular, a sua rápida degradação resulta na perda destes pontos de controlo, podendo levar à ocorrência de duplicações cromossómicas e anomalias centrossómicas. Já a acção principal da proteína *E7* passa pela capacidade de se associar à proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma (pRb), que deixa de regular negativamente o ciclo celular de G1 para S<sup>11,17</sup> (Figura 5). Ocorre, assim, degradação das proteínas p53 e pRb pela via proteolítica dependente da ubiquitina, inactivando a sua função como controladoras do ciclo celular. Numa situação normal, quando ocorre uma lesão no DNA celular, as proteínas p53 e pRb impedem o ciclo celular, permitindo à célula activar os mecanismos de reparação do DNA<sup>11,17</sup>. No entanto, se estas proteínas celulares estão inactivas, não ocorrem os processos de reparação, dando origem a instabilidade genética, acumulação de mutações e, em última instância, ao desenvolvimento de neoplasia<sup>11,17,26-28</sup> (Figura 5).



**Figura 5** – Representação esquemática da acção das oncoproteínas *E6* e *E7* e sua relação com o ciclo celular. As *E6* e *E7* ligam-se às proteínas celulares p53 e pRb respectivamente, alterando as suas funções e vias de regulação do ciclo celular (adaptado de Burd<sup>12</sup>).

Sabe-se que a infecção se inicia na zona de transformação do epitélio do colo do útero, provavelmente em microfendas do epitélio, que expõem as células da camada basal à entrada do vírus<sup>12</sup> (Figura 6). Uma vez no núcleo das células basais, o vírus pode permanecer sem se multiplicar (infecção latente) ou a qualquer momento iniciar a sua replicação (infecção produtiva). À medida que as células infectadas por HPV se dividem e os genomas virais são divididos pelas células filhas, destacam-se da camada basal, migram pela camada granulosa e sofrem diferenciação. Nas células da camada basal, a expressão dos genes virais está suprimida, apesar da expressão de genes precoces (como *E6* e *E7*) resultar no aumento da proliferação das células infectadas e na sua expansão lateral<sup>12</sup>.



**Figura 6** – Representação esquemática do mecanismo de infecção do HPV no colo do útero, mostrando o epitélio pavimentoso estratificado e a expressão de proteínas virais durante a infecção. Após a infecção das células da camada basal por HPV, ocorre a produção de proteínas virais não estruturais. Sob a regulação destas proteínas, as células em divisão sofrem expansão vertical e a diferenciação epitelial é atrasada. As proteínas virais são expressas sequencialmente ao longo da diferenciação e são libertados vírus maduros nas camadas superficiais do epitélio (retirado de Silva<sup>17</sup>).

Posteriormente, quando a infecção atinge células das camadas intermédias do epitélio, estas deixam de se dividir e começam a diferenciar-se progressivamente, e a

transcrição e replicação viral tendem a aumentar. Inicia-se, também, a expressão de genes virais tardios, o genoma viral é replicado, formando-se estruturas proteicas. Como resultado, são libertadas partículas virais completas nas camadas superiores da mucosa<sup>12</sup> (Figura 6).

A diferença no potencial oncogénico entre os HPVs de baixo e alto risco está relacionada com diferenças nas propriedades das proteínas oncogénicas *E6* e *E7*, nomeadamente a diferente afinidade para as proteínas p53 e pRb, respectivamente<sup>29</sup>. A frequência de integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira correlaciona-se com o grau da lesão, sendo raro em condilomas e lesões de baixo grau e comum em lesões de alto grau<sup>30</sup>. Também a carga viral se relaciona com a progressão das neoplasias intraepiteliais do colo do útero. Em mulheres infectadas por um determinado tipo de HPV, verificou-se que as portadoras de maior carga viral tendem a apresentar, com maior frequência, lesões associadas a essa infecção<sup>17,31</sup>.

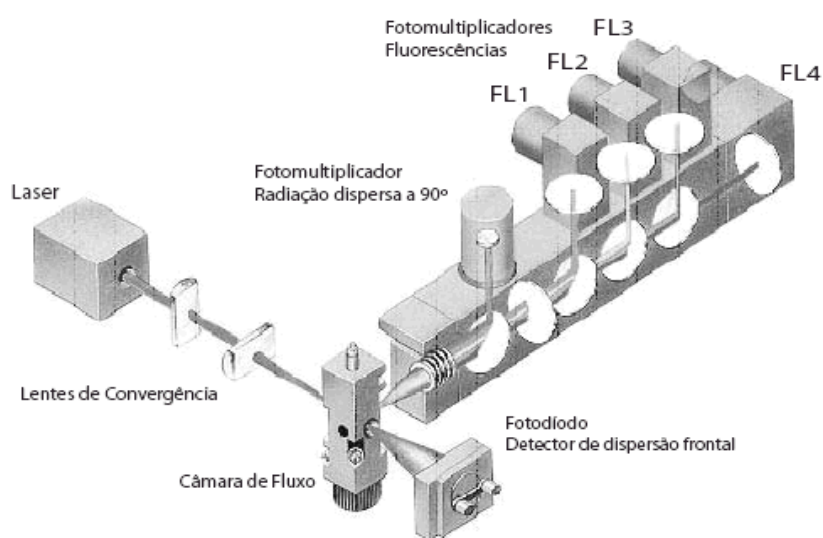
Dos distúrbios resultantes do processo de carcinogénese, vão ocorrer alterações cromossómicas numéricas e estruturais, provocando alterações no valor total do conteúdo de DNA nuclear das células, em geral correspondendo a alterações de aneuploidia. Na CIN e no carcinoma cervical invasivo, a estimativa do conteúdo de DNA foi estabelecida como um factor de prognóstico permitindo estimar o risco relativo de progressão para lesões mais avançadas<sup>7,20,24-27,32-34</sup>. Assim, as lesões aneuplóides provavelmente persistem ou progridem até à malignidade, enquanto lesões diplóides ou poliplóides regridem. No colo uterino a presença de aneuploidia em lesões pavimentosas intraepiteliais (SIL) está estritamente correlacionada com o seu grau, estando presente em 75 a 100% das utentes com lesões de alto grau<sup>33</sup>. Se a aneuploidia do epitélio pavimentoso exocervical pode prever o desenvolvimento de uma anomalia histomorfológica em lesões de alto grau, esta característica pode assim ser útil na identificação de indivíduos que requerem maior atenção ou tratamento adicional<sup>33</sup>.

A aneuploidia cromossomal tem sido aceite como um evento chave precoce na carcinogénese. O conteúdo de DNA nuclear tem sido estudado em vários tipos de tumores através da citometria de fluxo (FCM) e citometria de imagem. Estas técnicas baseiam-se na determinação da ploidia do DNA e são empregues com o objectivo de criar parâmetros que possam fornecer informações complementares e mais precisas do que os métodos citológicos/histológicos tradicionais, nomeadamente sobre a distribuição do ciclo celular nos tumores, podendo ser posteriormente correlacionadas com as características clínico-patológicas<sup>33</sup>.

## CITOMETRIA DE FLUXO

A FCM é uma técnica que vem sendo usada com sucesso em todo o mundo, tanto na investigação básica como no diagnóstico clínico, ao constituir um complemento valioso das técnicas clássicas utilizadas para o estudo da morfologia, da biologia e da bioquímica celular.

Trata-se de um método rápido (analisa até 200.000 eventos/segundo), sensível e objectivo de análise de partículas a fluir em suspensão. Esta análise é efectuada num citómetro de fluxo, constituído por cinco componentes essenciais: fonte(s) de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), a câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos, fotodíodos ou fotomultiplicadores, e um sistema de processamento dos dados<sup>35</sup> (Figura 7).

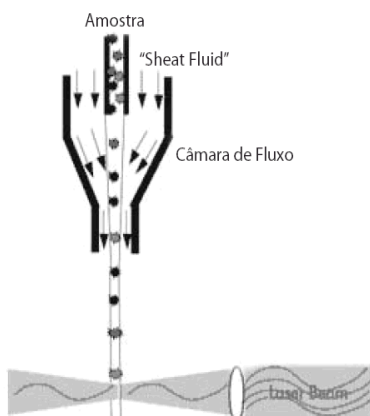


**Figura 7** – Modelo esquemático de um citómetro de fluxo, assinalando os principais componentes (retirado de Silva *et al*<sup>35</sup>).

Esta técnica permite medir propriedades ópticas nomeadamente a dispersão da luz e fluorescência de partículas (as partículas de interesse, como células ou núcleos, serão designadas a seguir por citomas) que fluem numa suspensão líquida. A FCM permite realizar a medição simultânea de vários parâmetros físicos e químicos (análises multiparamétricas) desses citomas. O princípio em que se baseia a FCM é simples: a suspensão líquida a analisar é introduzida na câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluído envolvente com velocidade superior à adquirida pela suspensão, e esta diferença de velocidades leva a que as partículas da suspensão se movam em regime laminar e individualmente no centro do fluxo sem se misturarem com o



fluido envolvente (focagem hidrodinâmica)<sup>35,36</sup>. Como resultado, durante este fluxo, cada partícula é intersectada por um ou mais feixes de luz/laser e, em resposta, a partícula leva a uma dispersão fotónica e/ou emissão de fluorescência<sup>37</sup> (Figura 8).



**Figura 8** – Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual dos citomas é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina (*sheat fluid*) (retirado de Silva *et al*<sup>35</sup>).

Os sinais de dispersão de luz e/ou fluorescência emitidas são detectados e amplificados por detectores/fotomultiplicadores adequados. Enquanto, a análise da dispersão frontal da luz fornece uma indicação da dimensão da partícula, a dispersão lateral representa a granularidade/complexidade e rugosidade de cada partícula<sup>38</sup>. Os dois tipos de dispersão da luz (lateral - *side scatter* (SS) e frontal - *forward scatter* (FS)) são característicos de cada citoma e, em conjunto, podem ser usadas para distinguir diferentes tipos de células numa amostra heterogénea (e.g., o caso clássico é a separação dos diferentes tipos de glóbulos brancos).

No caso da análise de fluorescência, esta pode ser por autofluorescência (por exemplo a clorofila nos cloroplastos), ou pela utilização de fluorocromos. Neste último caso, destacam-se fluorocromos marcadores de DNA, que por intercalação (como o iodeto de propídio (IP)) ou por ligação a bases (e.g. DAPI), permitem visualizar emissão de fluorescência proporcional ao DNA existente, nomeadamente o DNA nuclear. As medições de fluorescência com diferentes comprimentos de onda de emissão permitem obter informações qualitativas e quantitativas simultaneamente de vários compostos marcados.

Os sinais luminosos detectados são amplificados e convertidos em pulsos eléctricos pelos tubos fotomultiplicadores, e, em seguida, estes pulsos eléctricos são

convertidos em pulsos analógico-digitais que, por sua vez, são processados numa escala arbitrária (1024 canais), tornando possível a acumulação dos sinais emitidos por cada uma das partículas, em tempo real, na forma de histogramas mono ou biparamétricos, visualizados no monitor de um computador<sup>37</sup>. O *software* existente na maior parte dos citómetros permite igualmente efectuar uma análise estatística básica, útil para a interpretação dos resultados, que inclui a média, a moda e a posição do canal do pico, assim como, o coeficiente de variação (CV).

As potencialidades de análise bi/multiparamétrica rápida e em subpopulações muito grandes de células/partículas, é sem dúvida uma das grandes vantagens da FCM. Assim, em comparação com os métodos bioquímicos de análise celular em que se obtém um resultado médio para toda a amostra, a FCM proporciona uma informação quantitativa sobre cada citoma em particular, pelo que permite identificar em cada amostra subpopulações de células diferentes, mesmo que estas se encontram escassamente representadas<sup>39,40</sup>. Contudo esta técnica apresenta também potenciais limitações, como a necessidade de obter citomas em suspensão, pelo que se perde informação sobre a arquitectura tecidual ou celular e sobre a relação que cada célula, núcleo ou cromossoma, em particular, estabelece com o meio circundante<sup>39,40</sup>.

A importância conceptual da Citometria advém, também, do facto de adicionar à citologia convencional qualitativa, que se baseia numa análise subjectiva da morfologia celular e da citoquímica, a componente quantitativa objectiva. Desta forma, a FCM pretende que as suas análises citométricas sejam cada vez mais específicas (menor probabilidade de falsos positivos), mais sensíveis (menor probabilidade de falsos negativos), mais reprodutíveis e robustas estatisticamente e mais automáticas e rápidas<sup>41</sup>.

### **CITOMETRIA DE FLUXO E CITOLOGIA CERVICO-VAGINAL – Análise das células epiteliais do colo do útero**

Entre diversos estudos, podemos destacar os desenvolvidos por Kashyap *et al* (1998)<sup>42</sup>, em 50 utentes com displasia cervical leve, moderada e grave, utilizando citometria. Estes demonstraram que 44% das utentes tinham um padrão aneuplóide de DNA, ao passo que a positividade para HPV de alto risco oncogénico foi encontrado em 46% da amostra. O acompanhamento destes dados revelou que 72,7% das utentes que tiveram um padrão aneuplóide de DNA e foram positivos para o HPV de alto risco

progrediram para carcinoma *in situ*, comparando com 4,4% das utentes que foram positivas para o HPV de alto risco e tiveram um padrão euplóide de DNA<sup>42</sup>.

Grundhoefer *et al* (2001)<sup>8</sup> e mais recentemente Kottaridi *et al* (2009)<sup>43</sup> descreveram a FCM como uma técnica rápida que permite determinar quantitativamente a adequação de uma CCV em meio líquido, antes da preparação das lâminas e da sua avaliação morfológica. Os mesmos autores salientam, ainda, que a utilização da marcação por anticorpos específicos permite a distinção das diferentes subpopulações celulares passíveis de encontrar na CCV<sup>8,43</sup>.

Singh *et al* (2008)<sup>25</sup> demonstraram que a combinação do rastreio pela CCV e a análise do seu conteúdo de DNA nuclear, por FCM, aumenta a sensibilidade e a especificidade da detecção de lesões com carácter progressivo.

Vários outros estudos confirmam a utilidade da FCM como um método adjuvante, adequado para o diagnóstico e prognóstico de diversos tumores<sup>7,26,34,44,45</sup>. Considerada anteriormente como uma ferramenta de pesquisa, a FCM tem-se tornado uma técnica laboratorial proveitosa e de baixo custo para estabelecer, objectivamente e com reprodutibilidade, um diagnóstico precoce de lesões com potencial progressivo.

Para a determinação do carcinoma cervical, o uso das técnicas actuais, como o Papanicolaou, apresenta uma sensibilidade longe do ideal (84% na citologia em meio líquido), admitindo um elevado número de falsos negativos. Os testes moleculares quando apresentam resultados positivos para tipos virais altamente oncogénicos, não determinam necessariamente o desenvolvimento de uma displasia, sendo necessários vários outros factores concomitantes. O uso de novas técnicas de análise preditivas, confiáveis e reprodutíveis podem ser admitidas.

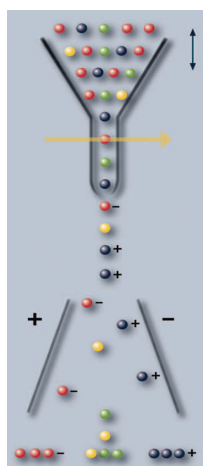
Em Portugal, a técnica de FCM não tem sido utilizada como complemento para análises laboratoriais de rastreio do cancro do colo do útero.

## **SEPARADOR CELULAR ACTIVADO POR FLUORESCÊNCIA – “SORTER”**

A grande maioria dos citómetros de fluxo existentes nos laboratórios está dotada exclusivamente da capacidade de análise de partículas (qualitativa e quantitativa). No entanto, citómetros de fluxo mais avançados dispõem também da possibilidade de separar citomas com base em características isoladas ou em combinação previamente seleccionadas, através de um equipamento comumente designado de “Sorter” – Separador Celular Activado por Fluorescência (FACS). Estas características podem ser

funcionais, bioquímicas ou morfológicas e, como, à partida, estas células não sofrem qualquer dano durante o processo, podem ser posteriormente utilizadas em qualquer outro ensaio experimental *in vitro* ou *in vivo*, já que todo o processo pode ser feito sob condições estéreis<sup>40</sup>.

Aplicam-se dois princípios diferentes para a separação celular: métodos mecânicos e métodos electrostáticos, sendo estes últimos os mais utilizados. Em geral, os métodos electrostáticos baseiam-se na seriação celular através de uma vibração ultrassónica aplicada à corrente de fluxo, para que esta se fragmente e forme gotículas (idealmente com apenas uma partícula), logo após a intercepção com o laser. Interpretados os sinais obtidos para cada célula e se esta satisfaz os critérios de separação, o aparelho aplica uma carga eléctrica de uma dada polaridade sobre toda a corrente. Uma vez que a gotícula que contém a célula de interesse sai da corrente, esta última é descarregada. A partir deste momento, a única partícula carregada no fluxo da amostra é a gotícula que contém a célula específica. Ao avançar no seu trajecto descendente, a gotícula entra num campo electrostático criado por duas placas carregadas, uma positiva e outra negativamente. Esta será atraída pela placa de carga eléctrica oposta e se soltará da corrente principal, ocorrendo uma alteração da sua trajectória que permitirá ser colhida por tubos colectores<sup>39</sup> (Figura 9).



**Figura 9** – Representação esquemática de um FACS, com base em métodos electrostáticos<sup>39</sup>.

Actualmente, é possível separar duas subpopulações celulares diferentes da mesma amostra com um grau de pureza superior a 99%<sup>40</sup>, a uma velocidade que pode ser da ordem dos 70.000 eventos/segundo<sup>46</sup>.

## OBJECTIVOS

Dada a pouca informação disponível no âmbito da análise de células epiteliais do colo do útero por FCM, foi objectivo geral deste trabalho avaliar as potencialidades desta técnica na análise de CCV em meio líquido. Para além disso, procurou-se desenvolver novas competências relativas ao domínio técnico de várias ferramentas (nomeadamente microscopia de fluorescência (MF), FCM e FACS) potencialmente relevantes para estudos de CCV, em particular, e de Anatomia Patológica, em geral.

No sentido de atingir o objectivo geral procurou-se:

- \* Adquirir prática no manuseamento/preparação de amostras de CCV em meio líquido, para análise por MF, FCM e FACS.

- \* Classificar e descrever as diferentes subpopulações celulares passíveis de encontrar, nas nossas amostras, pela análise por FCM/FACS:

- Utilizar a separação por FS, SS e marcação com IP;
- Utilizar a marcação com anticorpos (Ac), nomeadamente com o Ac CD45), para distinguir subpopulações leucocitárias de subpopulações não leucocitárias;
- Aplicar o FACS para separar subpopulações marcadas pelo Ac CD45 e caracterizá-las por microscopia óptica (MO).

- \* Analisar condições de preservação, nomeadamente o tempo de fixação, na qualidade dos citogramas obtidos por CMF.

- \* Avaliar possível correlação entre perfis celulares obtidos pela análise de CCV por FCM, com o resultado citológico da mesma amostra obtido pela classificação de Bethesda 2001.

- \* Efectuar ensaios da aplicabilidade da FCM em CCV em meio líquido, na avaliação de alterações da ploidia de células epiteliais do colo do útero.

---

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

---



## AMOSTRAGEM

Este estudo foi retrospectivo e compreendeu uma amostragem de 54 casos de CCVs preservadas em meio líquido *PreservCyt* (*Thinprep*<sup>®</sup>, Cytoc Corporation, Boxborough, EUA). Os casos foram colhidos em meio hospitalar, entre Novembro de 2008 e Abril de 2009, e enviados para um laboratório de Anatomia Patológica A (na região Norte de Portugal). A idade das utentes variou entre os 20 e os 83 anos, sendo a média de idade de 43,3 anos (Anexo 1). O tratamento, análise e formulação de resultado citológico, por classificação de Bethesda 2001, foi elaborado naquele laboratório.

## ANÁLISE E CAPTAÇÃO DE IMAGENS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Após selecção dos casos, efectuou-se o levantamento dos frascos, das lâminas, e do resultado citológico correspondente a cada caso; as lâminas foram revistas utilizando o microscópio óptico Nikon Eclipse 50i (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) e foram captadas imagens de alguns dos casos com o sistema fotográfico Nikon Digital Sight DS-5M (Nikon Corporation, Tóquio, Japão).

Segundo a classificação de Bethesda 2001 (ver Introdução, página 10), os 54 casos analisados foram divididos em 7 grupos:

- 13 casos de “Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade” (“NILM”);
- 16 casos de “NILM-Atrofia”;
- 10 casos de “NILM-Inflamação”;
- 4 casos de “Células pavimentosas atípicas - de significado indeterminado” (“ASC-US”);
- 5 casos de “Lesão intraepitelial de baixo grau” (“LSIL”);
- 4 casos de “Lesão intraepitelial de alto grau” (“HSIL”);
- 2 casos de “Carcinoma epidermóide”.

Os critérios adoptados para esta classificação (segundo Bethesda 2001<sup>32</sup>), foram:

- **NILM:** Ausência de evidência celular e nuclear de neoplasia. Sem evidência de microorganismos, podendo contemplar alterações reactivas não neoplásicas.
- **NILM-Atrofia:** Ausência de evidência celular e nuclear de neoplasia. Com presença de células parabasais isoladas ou em folhetos com polaridade nuclear preservada; cromatina uniformemente distribuída; núcleos nus resultantes da autólise; material amorfo basófilo (*blue blobs*) resultante da degeneração das células parabasais ou espessamento do muco; células parabasais degeneradas eosinófilas ou orangófilas



com núcleo picnótico; histiócitos de variados tamanhos e formas; e abundante exsudado inflamatório pode estar presente.

- **NILM-Inflamação:** Ausência de evidência celular e nuclear de neoplasia. Observa-se ligeiro aumento nuclear de  $1^{1/2}$  a 2 vezes o tamanho da área do núcleo de uma célula pavimentosa normal intermediária (aproximadamente  $35\mu\text{m}^2$ ); ocasional binucleação ou multinucleação; contorno nuclear regular, liso e uniforme; a hipercromasia moderada pode estar presente, mas com cromatina fina e uniformemente distribuída. O citoplasma pode mostrar policromasia, vacuolização ou halos perinucleares mas sem espessamento periférico; presença de (abundante) exsudado inflamatório, constituído maioritariamente por polimorfonucleares neutrófilos (PMNs).

- **ASC-US:** Núcleos com aproximadamente  $2^{1/2}$  a 3 vezes o tamanho da área do núcleo de uma célula pavimentosa normal intermediária. A relação núcleo-citoplasma (N/C) está ligeiramente aumentada; hipercromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou da forma nuclear. Pode ocorrer anormalidade nuclear associada a citoplasma denso e orangófilo (paraqueratose atípica).

- **LSIL:** O aumento nuclear é, pelo menos, 3 vezes a área do núcleo de uma célula intermediária normal, resultando em aumento da N/C com maturação bem definida do citoplasma. Os graus variáveis de hipercromasia nuclear são acompanhados por variações no tamanho nuclear, número e forma. A binucleação ou multinucleação estão geralmente presentes; a cromatina apresenta-se, em geral, uniformemente distribuída, mas grosseiramente granular; no entanto, pode apresentar-se baça ou degenerada. O contorno da membrana nuclear é normalmente ligeiramente irregular, mas pode ser liso. Frequentemente surgem coilócitos, células com cavidades perinucleares de contornos irregulares e atipia nuclear; no entanto, estes não são indispensáveis para a classificação como LSIL.

- **HSIL:** As células apresentam menos maturação que na LSIL. O tamanho da célula é variável, afectando principalmente células do tipo basal. A hipercromasia nuclear é acompanhada por variações no tamanho nuclear e forma; o grau de aumento nuclear é mais variável do que o visto na LSIL. Algumas células com HSIL apresentam o mesmo grau de aumento nuclear como na LSIL, mas a área do citoplasma está diminuída, levando ao aumento mais acentuado da N/C. Outras células apresentam uma N/C muito elevada, mas o tamanho real dos núcleos pode ser consideravelmente menor do que na LSIL. A cromatina pode ser fina ou grosseiramente granular e com distribuição uniforme. O contorno da membrana nuclear é bastante irregular e frequentemente demonstra fendas proeminentes e estrias.

- **Carcinoma epidermóide:** Maioritariamente células isoladas, marcada variação no tamanho e na forma, com células caudadas e fusiformes, que frequentemente têm citoplasma denso e orangófilo. Também o núcleo tem variação marcada de tamanho, membrana irregular e opacidade nuclear está muitas vezes presente. A cromatina apresenta-se grosseiramente granular e irregularmente distribuída. Alterações queratóticas associadas podem estar presentes, mas não são suficientes para interpretação como carcinoma na ausência de anomalias nucleares. A diátese tumoral está muitas vezes presente.

#### **ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO**

A análise por FCM foi efectuada no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, utilizando o citómetro de fluxo Coulter EPICS-XL (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, EUA), equipado com um laser de árgon arrefecido com ar, com 15mW e a operar a 488 nm; apresentando para além dos sensores de dispersão frontal e lateral, quatro sensores de fluorescência. Para análise dos resultados e interpretação de citogramas foi utilizado o programa “FlowJo” (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, EUA).

#### **\* Análise de dispersão da luz e de fluorescência por marcação com iodeto de propídio**

No estudo por citometria de fluxo (dispersão frontal e lateral de luz e fluorescência da interacção IP-DNA) analisaram-se todos os 54 casos dos sete grupos previamente definidos. Para todos foi aplicado o seguinte protocolo: uma alíquota de 2 mL de cada citologia foi centrifugada a 2.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5804R, Hamburg, Alemanha) durante 15 minutos, removendo-se, de seguida, o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento em PBS pH=7,4. À suspensão adicionou-se 50 µg mL<sup>-1</sup> de RNase (Sigma, St. Louis, MO, EUA), para eliminar o RNA, e 50 µg mL<sup>-1</sup> de IP (Fluka, St. Louis, MO, EUA) para marcar o DNA nuclear. Depois da adição destes reagentes, as amostras foram incubadas durante 15 minutos e posteriormente analisadas no citómetro de fluxo. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até se proceder à sua análise.

A análise aproximada do volume das células constituintes de cada amostra foi determinada por dispersão frontal da luz (FS) e a análise da sua complexidade foi avaliada por dispersão lateral (SS).

A fluorescência do complexo IP-DNA foi registada através de um filtro dicróico *long-pass* a 645 nm e de um filtro *band-pass* a 620 nm e convertida em 1024 canais. Os resultados foram adquiridos usando o programa SYSTEM II versão 3.0 (Beckman Coulter®). Em cada réplica, sempre que possível, foram analisados pelo menos 10.000 eventos<sup>47</sup>. Os núcleos agregados (dupletos), núcleos parciais, núcleos associados ao citoplasma e outro lixo presente nas amostras, foram eliminados da análise definindo uma região específica no citograma representativo da área vs altura do pico da FL.

Para avaliar se o tempo de fixação afectava o perfil dos citogramas/histogramas, seleccionou-se uma amostra que foi analisada ao longo do tempo: 3, 6, 7, 8 e 9 semanas. Ressalve-se que devido a problemas técnicos do citómetro, não foi entretanto possível analisar material fresco (tempo 0) que seria comparado com o material fixado.

#### **\* Análise segundo marcação por CD45 e iodeto de propídio**

Na tentativa de identificação das células epiteliais do colo do útero, elaborou-se um ensaio preliminar de marcação com o Ac CD45-FITC (presente em todas as células leucocitárias humanas; incluindo linfócitos, monócitos, granulócitos, eosinófilos e basófilos). Através desta marcação pretendeu-se fazer a distinção entre células leucocitárias (positivas para o Ac) e células não leucocitárias (negativas para o Ac), subpopulação na qual se incluem as células epiteliais do colo do útero. Para estabelecer este ensaio no laboratório, utilizaram-se duas amostras.

Este ensaio teve como base a metodologia recomendada pelo fabricante do Ac usado (BD Biosciences, S. Jose, EUA), mas com as adaptações necessárias para a utilização das nossas amostras. Resumidamente: uma alíquota de 2 mL foi centrifugada a 2.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5804R, Hamburg, Alemanha) durante 15 minutos, removendo-se, de seguida, o sobrenadante e ressuspendendo o sedimento em PBS pH=7,4. Adicionaram-se 20 µL de CD45, misturou-se bem e incubou-se a amostra a 4-8°C (no frigorífico) durante 15 minutos. De seguida, as amostras foram tratadas com 50 µg mL<sup>-1</sup> de RNase (Sigma, St. Louis, MO, EUA), para eliminar o RNA, e marcadas com 50 µg mL<sup>-1</sup> de IP (Fluka, St. Louis, MO, EUA), tal como atrás descrito. A análise foi feita após 15 minutos de incubação no escuro. Foram analisados no mínimo 10.000 eventos<sup>47</sup> de cada caso.

### **ANÁLISE E CAPTAÇÃO DE IMAGENS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

Os casos seleccionados para estudo da marcação por CD45 foram usados também para análise por MF. Às duas amostras foi retirada uma pequena alíquota de 20 µL e feita uma lâmina para observação ao microscópio de fluorescência Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão). A fluorescência do IP foi detectada com a unidade de espelho U-MWIG2 (filtro do tipo *band-pass* com excitação a 520-550 nm; filtro de emissão a 580 IF e espelho dicromático a 565 nm). Foram captadas imagens com o sistema fotográfico Olympus Camedia C-5060 (Olympus, Tóquio, Japão).

### **ANÁLISE POR FACS**

Para caracterização e comprovação da identidade de cada uma das subpopulações encontradas pela análise por FCM, dos 54 casos, seleccionaram-se oito casos para análise por FACS, utilizando-se para o efeito um BD FACSaria™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA), do Centro de Histocompatibilidade do Norte.

O princípio de separação celular deste equipamento baseia-se nos métodos electrostáticos. Efectuou-se a separação de duas subpopulações, aparentemente identificadas anteriormente por FCM (através da dispersão da luz): a subpopulação com menor FS e SS, foi separada para o tubo colector P1 (à esquerda) e subpopulação com maior FS e SS foi colhida pelo tubo colector P2 (à direita).

Posteriormente, foram feitos esfregaços das subpopulações obtidas em cada tubo, corados pela coloração de Papanicolaou e observados ao microscópio óptico.

### **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Os intervenientes no estudo comprometem-se a respeitar os princípios éticos da instituição, garantindo-se sempre o anonimato de cada um dos participantes e confidencialidade dos dados obtidos.



---

## 3. RESULTADOS

---



Todas as amostras de CCV em meio líquido (n=54), distribuídas pelos 7 grupos citológicos (Bethesda 2001), foram marcadas com IP e analisados em FCM. Da análise dos citogramas e histogramas obtidos, verificou-se a predominância de um perfil, contudo este teve diferentes graus de variação, tanto inter como intra grupos, principalmente entre os grupos “NILM-Atrofia” e “Carcinoma epidermóide”; e os restantes grupos. De seguida, cada um dos grupos é descrito e analisado individualmente.

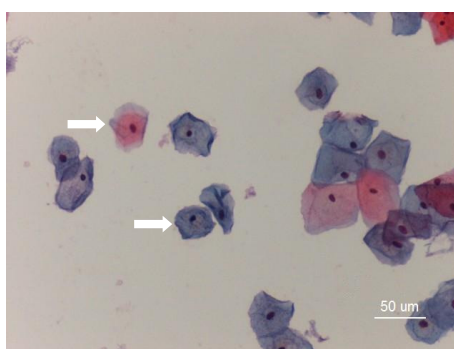
De salientar que, comparando os diagramas biparamétricos FS log vs SS log de diferentes amostras, estes podem apresentar diferentes densidades de agregados, pelo facto de, entre as amostras, se terem analisado diferentes quantidades de eventos (mínimo 10.538 eventos e máximo de 53.240 eventos).

Ainda a referir que na generalidade dos grupos citológicos existe alguma heterogeneidade a nível celular (observada por MO), uma vez que a ausência/presença de diferentes subtipos celulares assim como a sua quantidade, dependem de diferentes factores fisiológicos da mulher (e.g. fase do ciclo menstrual, idade).

#### PERFIS CITOLÓGICOS OBSERVADOS EM CADA GRUPO ANALISADO

##### \* NILM

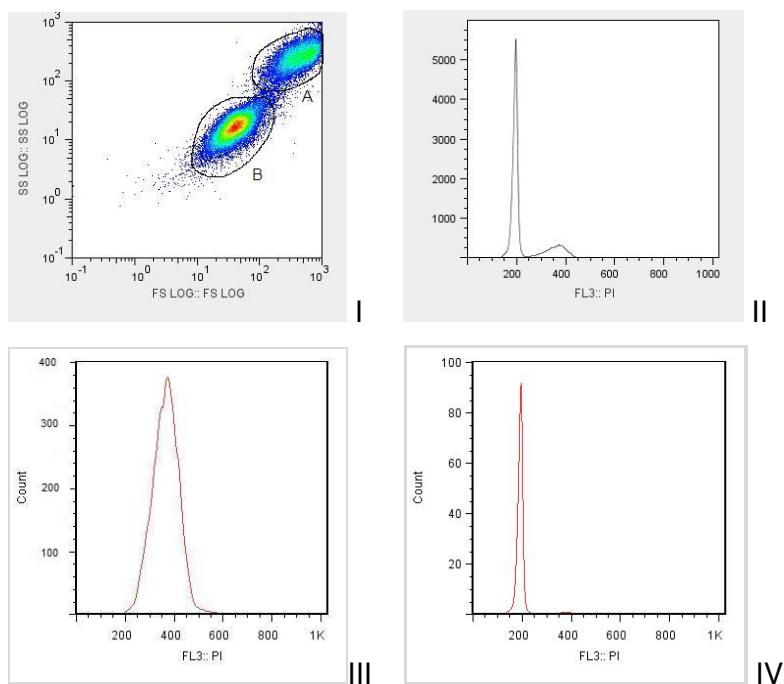
Com o resultado citológico de “NILM” (Figura 10) analisaram-se 13 amostras. Em geral, este grupo caracteriza-se pela ausência de características citomorfológicas de neoplasia, podendo, contudo, apresentar alterações reactivas não neoplásicas. Nenhuma destas amostras apresentava evidência de microrganismos patogénicos.



**Figura 10** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM” [coloração de Papanicolaou (PAP)]. Na imagem observa-se citologia de fundo limpo com células pavimentosas normais (seta branca).



Utilizaram-se amostras deste grupo para caracterização do comportamento da CCV em meio líquido por FCM. Começou-se, assim, pela análise de um caso com o resultado citológico “NILM”. Na Figura 11 apresentam-se o citograma e os histogramas referentes a este caso.



**Figura 11** – Representações gráficas de um caso “NILM”. **(I)** Diagrama biparamétrico FS log vs SS log mostrando duas subpopulações distintas (A e B). **(II)** Histograma da fluorescência do iodeto de propídio - FL3:IP das duas subpopulações. **(III)** Histograma da fluorescência do iodeto de propídio - FL3:IP da subpopulação A. **(IV)** Histograma da fluorescência do iodeto de propídio - FL3:IP da subpopulação B.

Da análise dos 13 casos pertencentes a este grupo, obtiveram-se os citogramas e histogramas representados na Figura 12.

Nos citogramas FS vs SS, em escala logarítmica, observou-se, em geral, duas subpopulações distintas, uma com maior FS e SS (subpopulação A) e outra com menor FS e SS (subpopulação B) (Figura 11 – I e Figura 12 – diagramas biparamétricos). Relativamente à marcação por IP, os histogramas mostraram dois picos distintos: a subpopulação A apresentava somente um pico, variável entre as amostras (em posição e intensidade), com mediana localizada entre o canal 200 e o canal 400, e que apresentava frequentemente elevados coeficientes de variação (CV) (entre 14,41 e 37,32). Em contrapartida, o histograma da subpopulação B apresentava um pico G0/G1 que, na

generalidade das amostras, se posicionou cerca do canal 200, com CV entre 6,03 e 13,0; e um correspondente pico G2 posicionado cerca do canal 400 (Figura 11 – II, III e IV e Figura 12 – histogramas).

Neste grupo citológico a proporção entre estas duas subpopulações (A e B) apresentou alguma variação entre as amostras, existindo situações em que as duas subpopulações se encontravam perfeitamente distintas (e.g. Figura 12 – diagrama biparamétrico D), e situações em que a subpopulação A se apresentava muito pouco abundante (Figura 12 – diagrama biparamétrico A, B e H) ou inexistente (Figura 12 – diagrama biparamétrico F).

Nas quatro amostras referidas como tendo subpopulações A pequenas ou ausentes, confirmou-se na análise da fluorescência do IP, que estas amostras apresentavam um pico pequeno, ou ausente, correspondente à subpopulação A (Figura 12 – histogramas A, B, F e H). Assim, na análise dos histogramas de fluorescência do IP notou-se, com excepção dos atrás referidos, dois picos distintos correspondentes, respectivamente às subpopulações A e B (Figura 12 - histogramas).

Neste seguimento e na tentativa de identificar a tipologia celular de cada uma das subpopulações, procedeu-se à análise de duas amostras através da marcação com IP e o Ac CD45, com vista à separação de células leucocitárias e células não leucocitárias, e, também, à análise de 8 amostras por FACS, no sentido de confirmar, através da visualização em MO, a identidade das subpopulações encontradas. Este procedimento é seguidamente descrito.

Diagramas biparamétricos FS log vs SS log

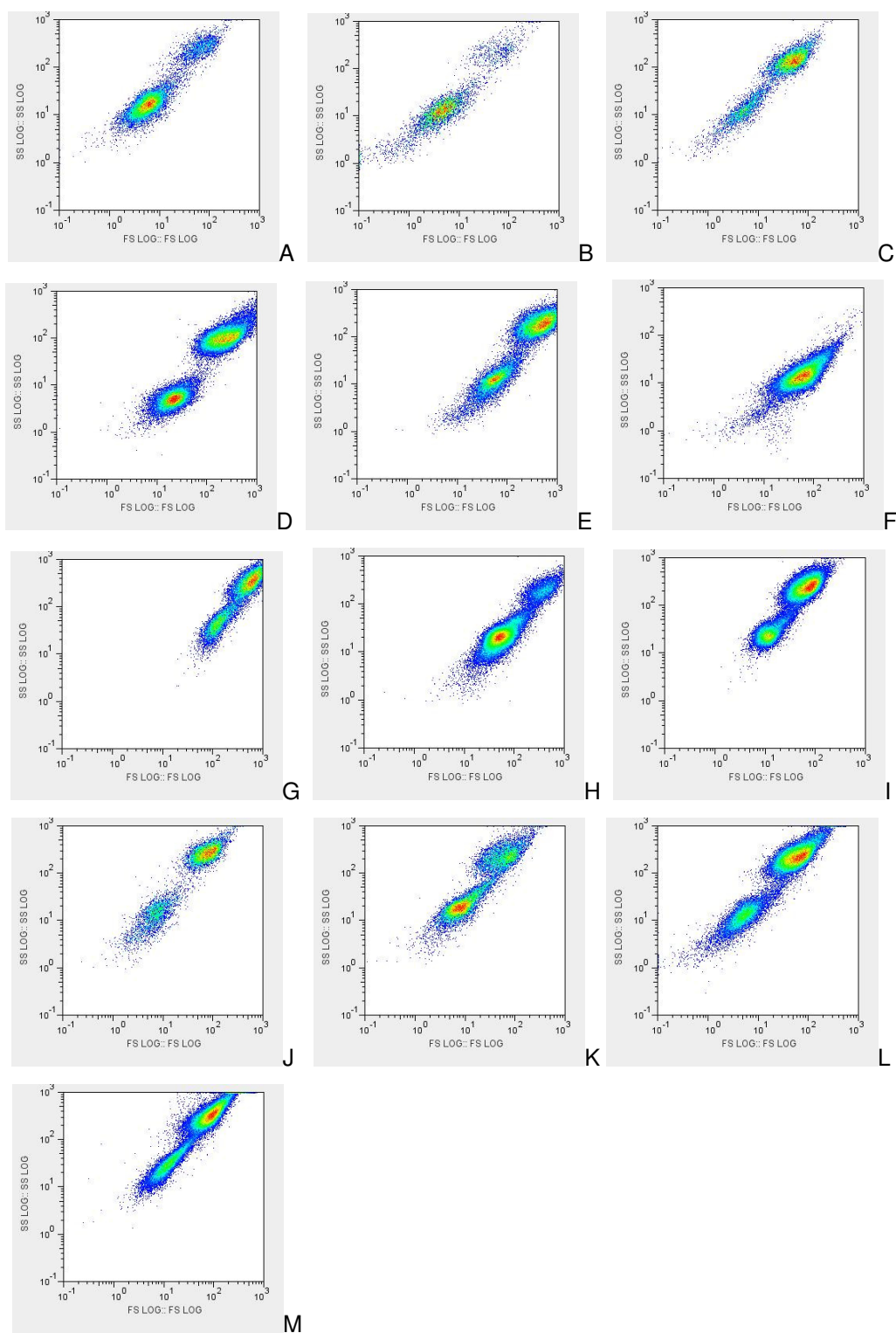
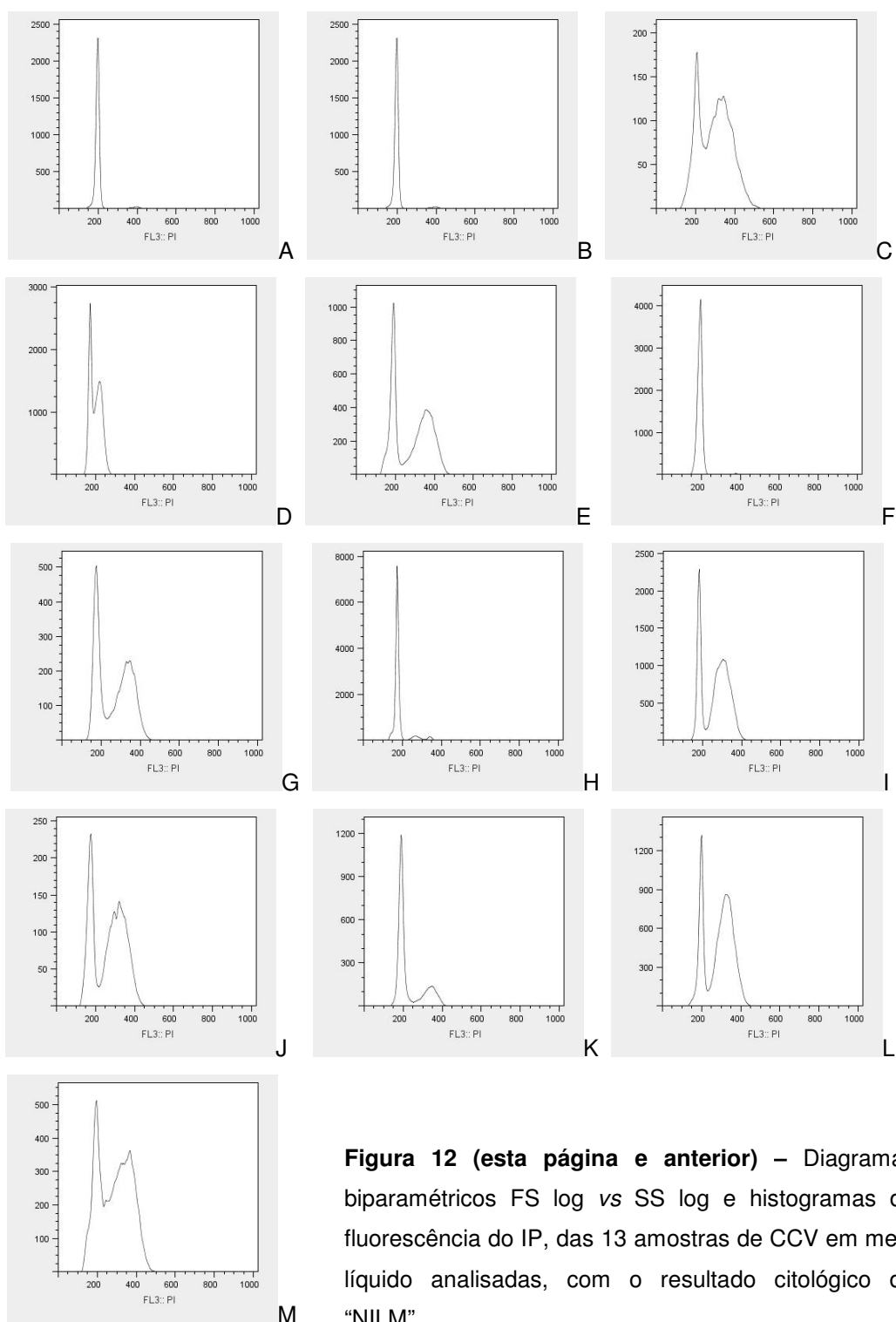


Figura 12

### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio



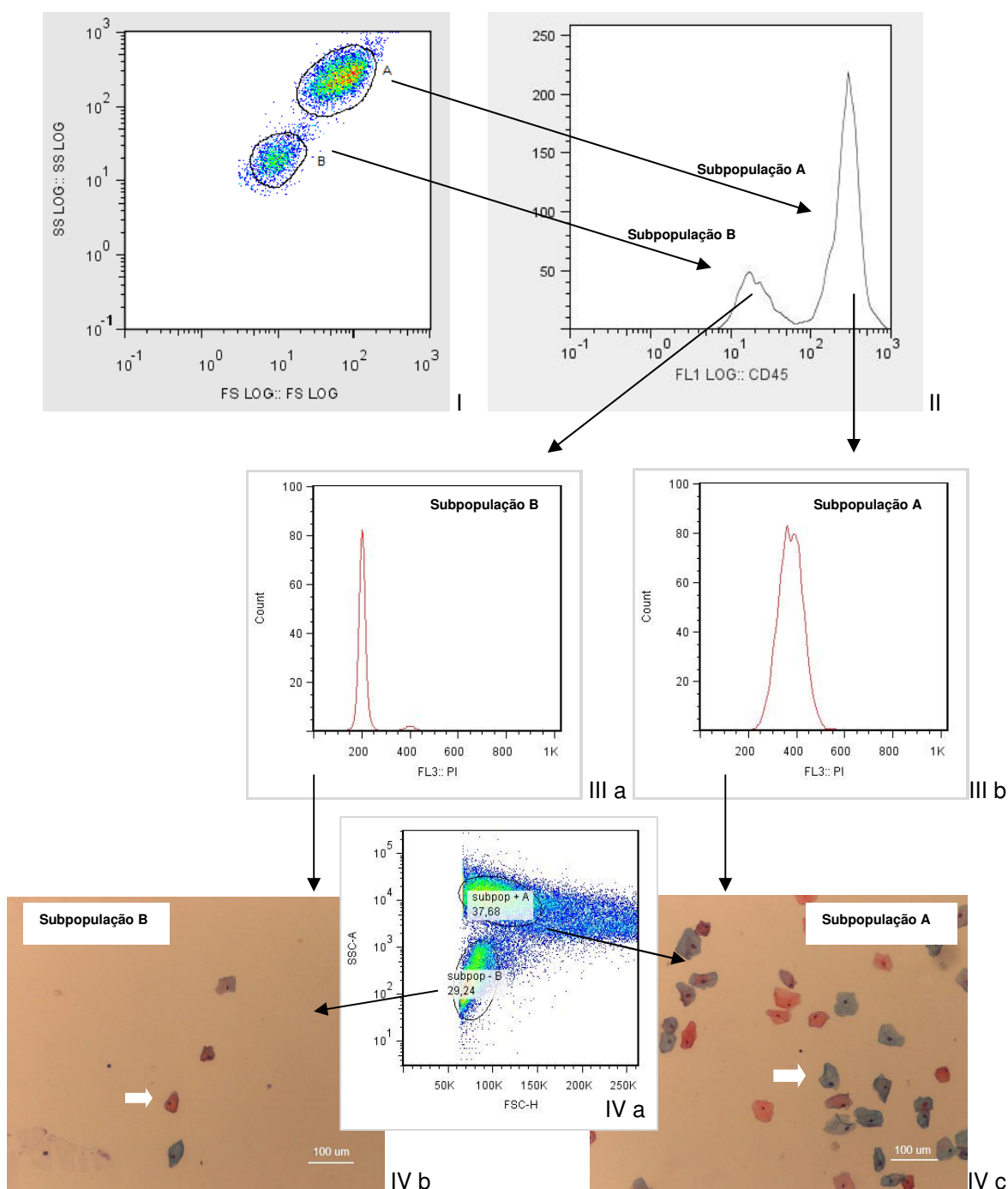
**Figura 12 (esta página e anterior)** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 13 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “NILM”.

**- Subpopulações celulares de CCV em meio líquido, por FCM e FACS – dispersão de luz, marcação por IP e marcação por CD45**

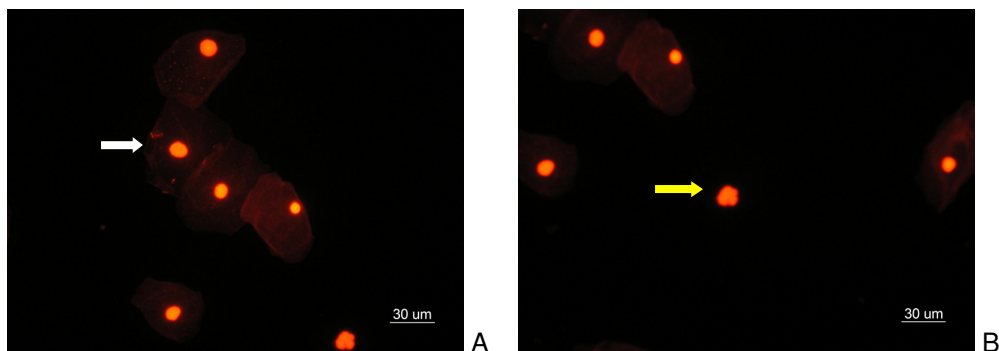
Na análise das duas amostras marcadas com IP e o Ac CD45 verificou-se, como já referido, a presença de duas subpopulações (A e B), no citograma FS log vs SS log (Figura 13 – I). Por correlação com o histograma FL1:CD45 verificou-se que a população A tinha forte marcação e a população B fraca marcação para este Ac (Figura 13 – II). A análise de cada uma destas subpopulações, segundo a marcação por IP mostrou, como também já foi descrito e neste caso específico, a subpopulação B com um pico dominante no canal 200 (correspondente a células em G0/G1) e um segundo pico residual no canal 400 (correspondente a células em G2). Já a subpopulação A apresentou um pico dominante próximo do canal do 400.

Referente à análise por FACS usaram-se 8 amostras, separando e recolhendo em diferentes tubos colectores a subpopulação A e a subpopulação B. Após esta separação, o conteúdo de cada tubo colector foi observado por MO, verificando-se em ambos a presença quase exclusivamente de células epiteliais do colo do útero, do tipo pavimentoso (Figura 13 - IV).

Ainda para observação microscópica da marcação por IP e CD45 efectuaram-se fotografias em microscópio de fluorescência. Obtiveram-se imagens da marcação por IP (Figura 14), onde se observou intensa marcação nuclear vermelha tanto nas células epiteliais do tipo pavimentoso como nas células leucocitárias do tipo PMN. Todavia, não se observou a marcação fluorescente por CD45 das células leucocitárias (marcação membranas verde).



**Figura 13** – (I) Diagrama biparamétrico FS log vs SS log demonstrando as duas subpopulações encontradas (A e B) na CCV em meio líquido, através da análise por FCM. (II) Histograma da fluorescência do CD45 - FL1:CD45, mostrando a marcação da subpopulação A e B: a subpopulação A apresenta forte marcação e a subpopulação B fraca marcação. (III a e b) Histogramas da fluorescência do IP - FL3:IP, com a representação do conteúdo de DNA nuclear de cada uma das subpopulações A (III b) e B (III a). (IV a b e c) Imagens de microscopia óptica (PAP), das células obtidas por FACS após separação da subpopulação A (IV c) e B (IV b), segundo o diagrama biparamétrico FSC-H vs SSC-A apresentado (IV a). As células observadas em ambas as imagens de microscopia óptica são células epiteliais, do tipo pavimentoso (seta branca).



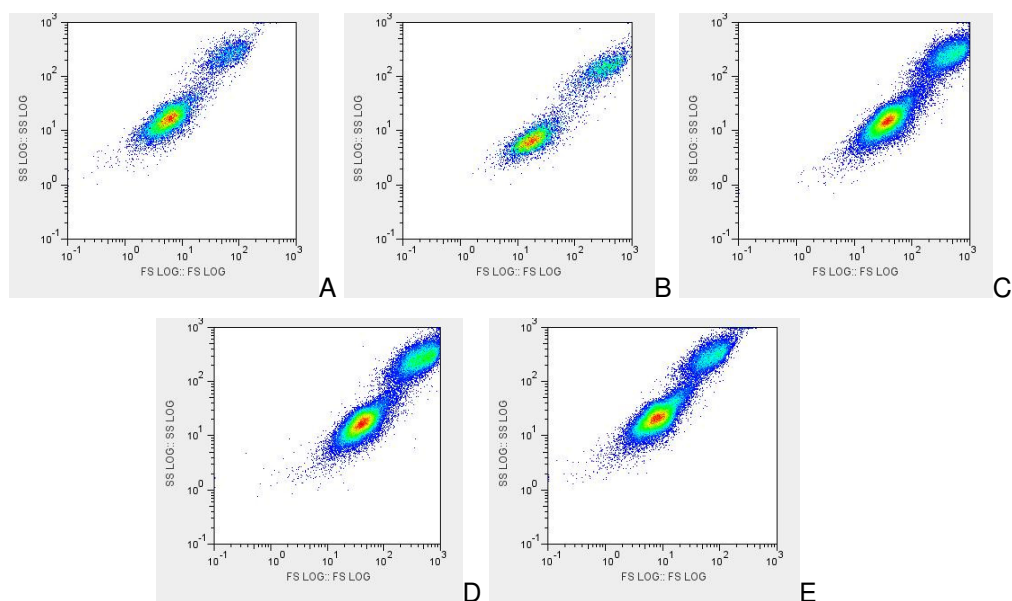
**Figura 14** – Imagens de microscopia de fluorescência, de células do colo do útero, com marcação por IP. **(A)** Maioritariamente células epiteliais pavimentosas (seta branca). **(B)** Ao centro, célula leucocitária do tipo polimorfonuclear neutrófilo (seta amarela).

#### - Citometria de fluxo vs tempo de fixação

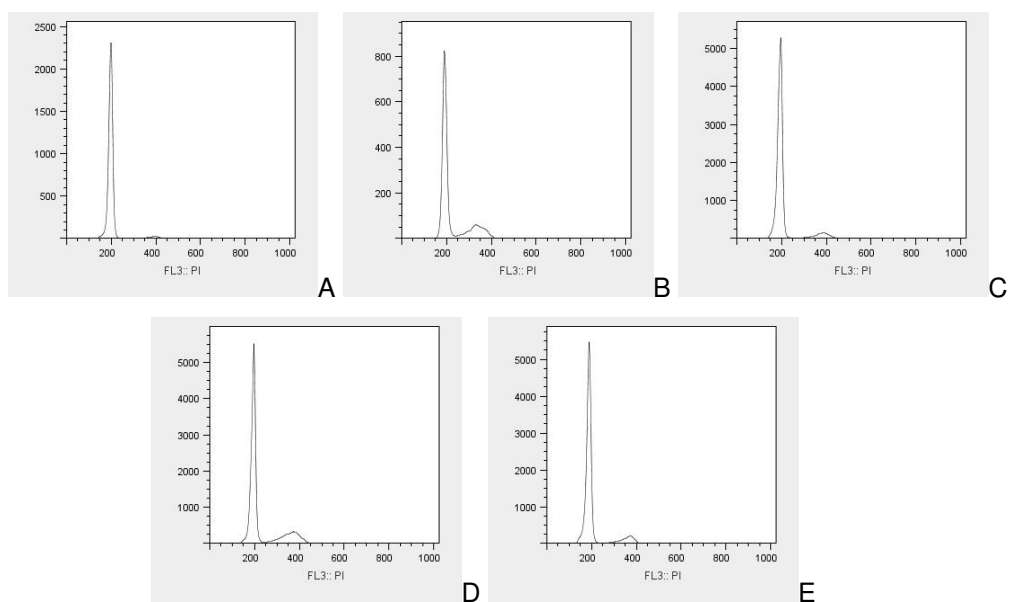
Ainda neste ensaio procurou-se avaliar a influência do tempo de fixação (em meio líquido *Thinprep*<sup>®</sup>) na qualidade da análise por FCM. Para o efeito, uma mesma amostra foi analisada em diferentes períodos de tempo, desde o mínimo de 3 semanas até 9 semanas de fixação. Obtiveram-se os diagramas biparamétricos segundo os eixos FS log vs SS log e os histogramas da fluorescência do IP, representados na Figura 14. O facto de existirem agregados de eventos mais densos nuns diagramas que noutros, deve-se ao facto de terem sido analisados diferentes valores de eventos totais, tendo assim os agregados diferentes intensidades.

Os resultados obtidos apresentaram citogramas e histogramas com ligeira variação mas em geral com similaridade entre si, sobretudo no que se refere a FS e SS (Figura 15). Por exemplo, na análise após 3 semanas de fixação (Figura 15 – representações gráficas A) observou-se a subpopulação A com 6,0% de eventos e a subpopulação B com 89,17%; após 9 semanas (Figura 15 – representações gráficas E) a subpopulação A apresentou 9,89% e a subpopulação B 86,38%. As medianas destas situações foram: após 3 semanas 195,49 e após 9 semanas 186,72. Visto ter sido analisado apenas um caso, não foi executado cálculo estatístico para comparação de valores.

### Diagramas biparamétricos FS log vs SS log



### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio

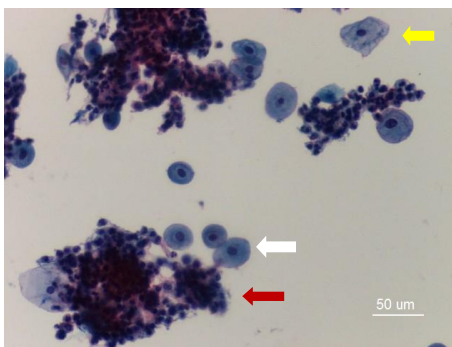


**Figura 15** - Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do iodeto de propídio de um mesmo caso de CCV em meio líquido analisado por FCM e em diferentes períodos de tempo, variando, deste modo, o tempo de fixação. (A) Após 3 semanas. (B) Após 6 semanas. (C) Após 7 semanas. (D) Após 8 semanas. (E) Após 9 semanas de fixação.



### \* NILM-ATROFIA

Voltando à análise dos diferentes grupos, relativamente ao resultado citológico de “NILM-Atrofia” (Figura 16), analisaram-se 16 casos no total, apresentando ao MO essencialmente células do tipo parabasal, sem evidência celular e nuclear de características de neoplasia. Histiócitos e PMNs podem estar presentes.



**Figura 16** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM-Atrofia” (PAP). Na imagem observam-se células parabasais (seta branca), células pavimentosas (seta amarela) e PMNs (seta vermelha).

Os diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas de marcação por IP estão representados na Figura 17. Com base na análise por dispersão de luz todos eles apresentam um perfil de “arrasto”, sendo na maioria difícil proceder à identificação de subpopulações distintas, embora pareça predominar o perfil da subpopulação B, estando o perfil da subpopulação A difuso ou ausente (Figura 17 – diagramas biparamétricos).

Pela análise do conteúdo de DNA nuclear, verificou-se uma grande heterogeneidade na sua distribuição (padrão assimétrico). De uma forma geral, o pico anteriormente identificado para a subpopulação B parece estar presente, embora este se encontre num canal abaixo (média das medianas = 170,66) daquele em que se encontra nos histogramas do grupo “NILM” (média das medianas = 184,08), verificando-se também um deslocamento de fluorescência entre os canais 100 e 600 (Figura 17 - histogramas).

Diagramas biparamétricos FS log vs SS log

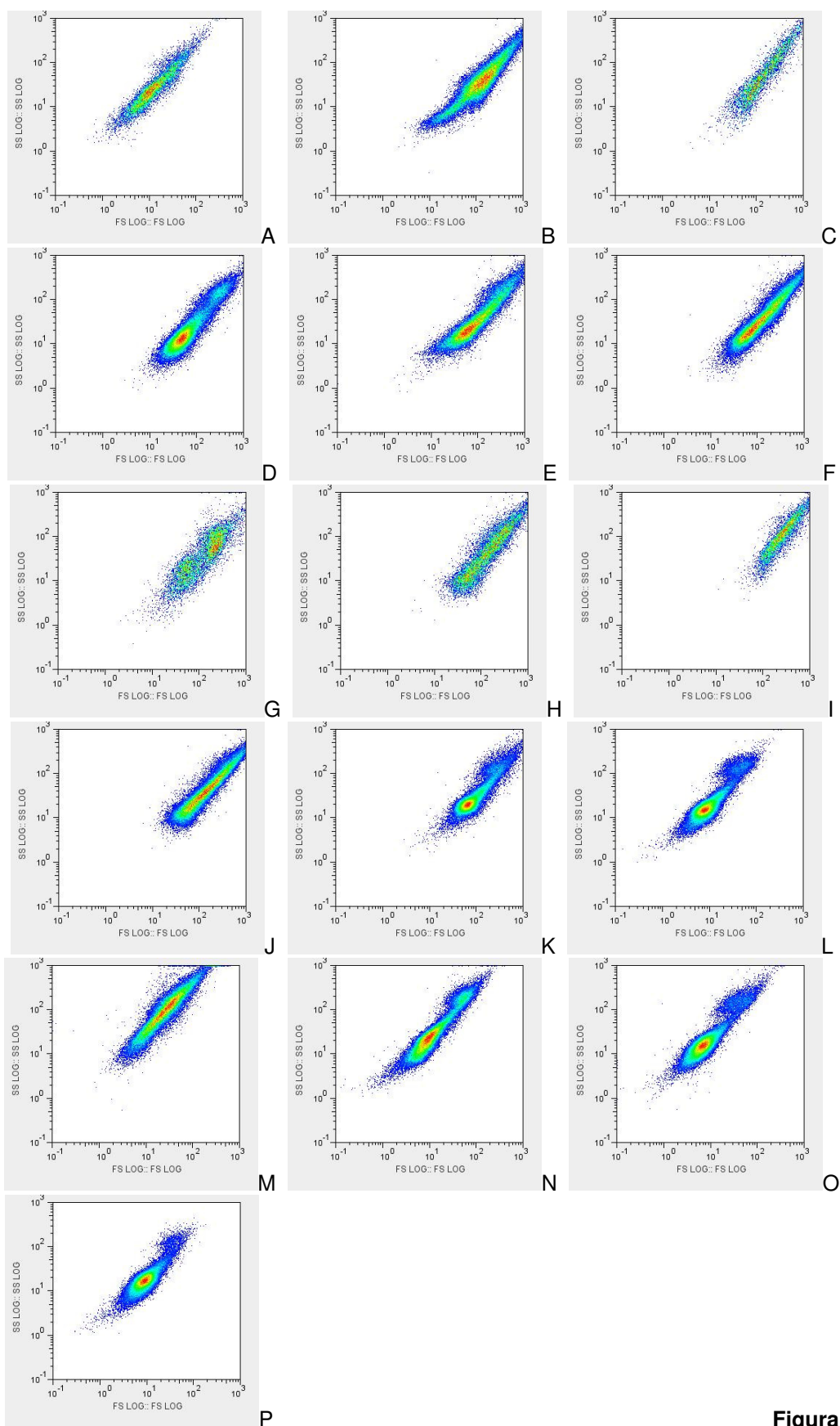
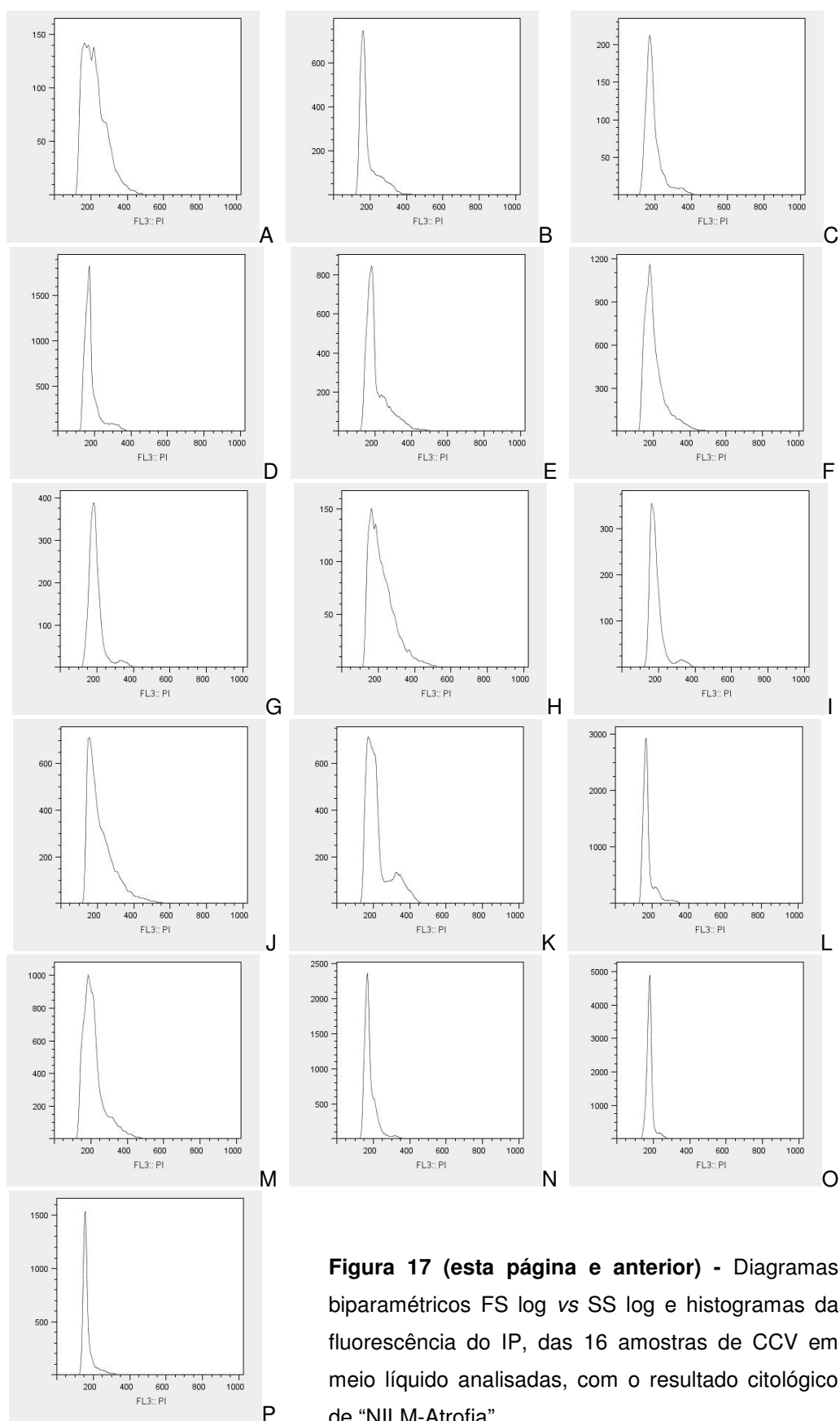


Figura 17

### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio

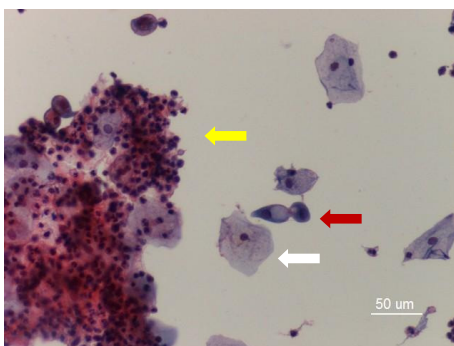


**Figura 17 (esta página e anterior)** - Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 16 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “NILM-Atrofia”.

### \* NILM-INFLAMAÇÃO

Analizados 10 casos de "NILM-Inflamação" (Figura 18), obtiveram-se as representações gráficas da Figura 19.

Em geral, neste resultado citológico observam-se células com ligeiro aumento nuclear, ocasional bi ou multinucleação, vacuolização e halos perinucleares, sem corresponderem a alterações neoplásicas, mas sim a alterações reactivas à inflamação, traduzindo-se pela presença de (abundante) exsudado inflamatório maioritariamente do tipo PMN.



**Figura 18** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM-Inflamação” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas (seta branca), abundantes PMNs (seta amarela) e alterações reactivas à inflamação – vacuolização citoplasmática (seta vermelha).

Na observação dos citogramas, foi possível distinguir em todas as amostras, duas subpopulações, com diferentes graus de definição e aglomeração. Com excepção da amostra C (subpopulação A 79,5% e subpopulação B 15,5%), todos os restantes casos apresentaram a subpopulação B com aglomerado consideravelmente mais denso (maior % de citomas) que a subpopulação A (Figura 19 – diagramas biparamétricos (e.g. amostra J: subpopulação A 3,03% e subpopulação B 95,84%)).

Quanto aos histogramas da fluorescência do IP, estes mostraram-se concordantes com os resultados obtidos nos citogramas, em que a existência de um pico cerca do canal 200, com CV entre 4,80 e 16,23, reflecte a presença da subpopulação B; enquanto o pico característico da subpopulação A é pequeno ou ausente (Figura 19 – histogramas).

Diagramas biparamétricos FS log vs SS log

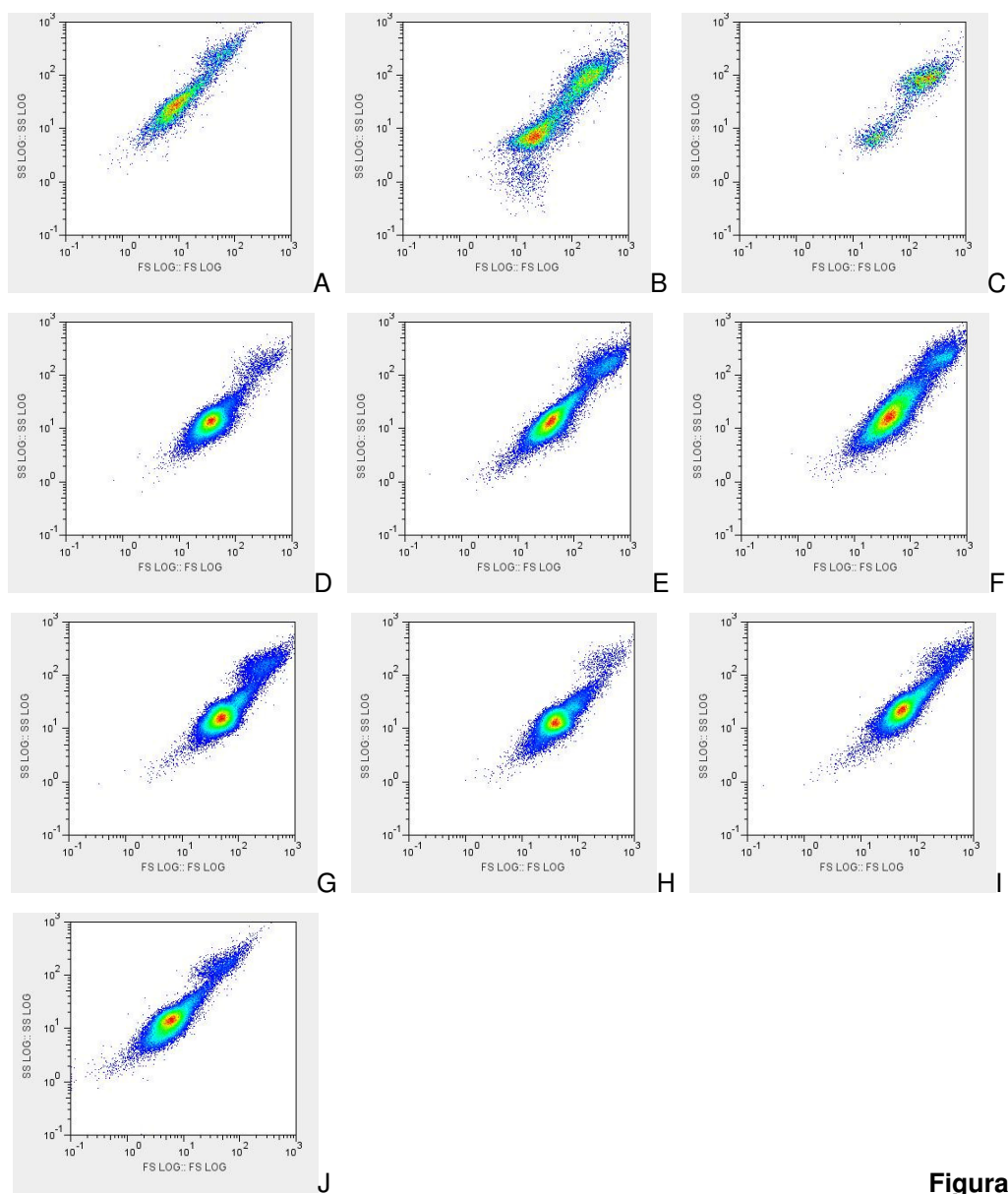
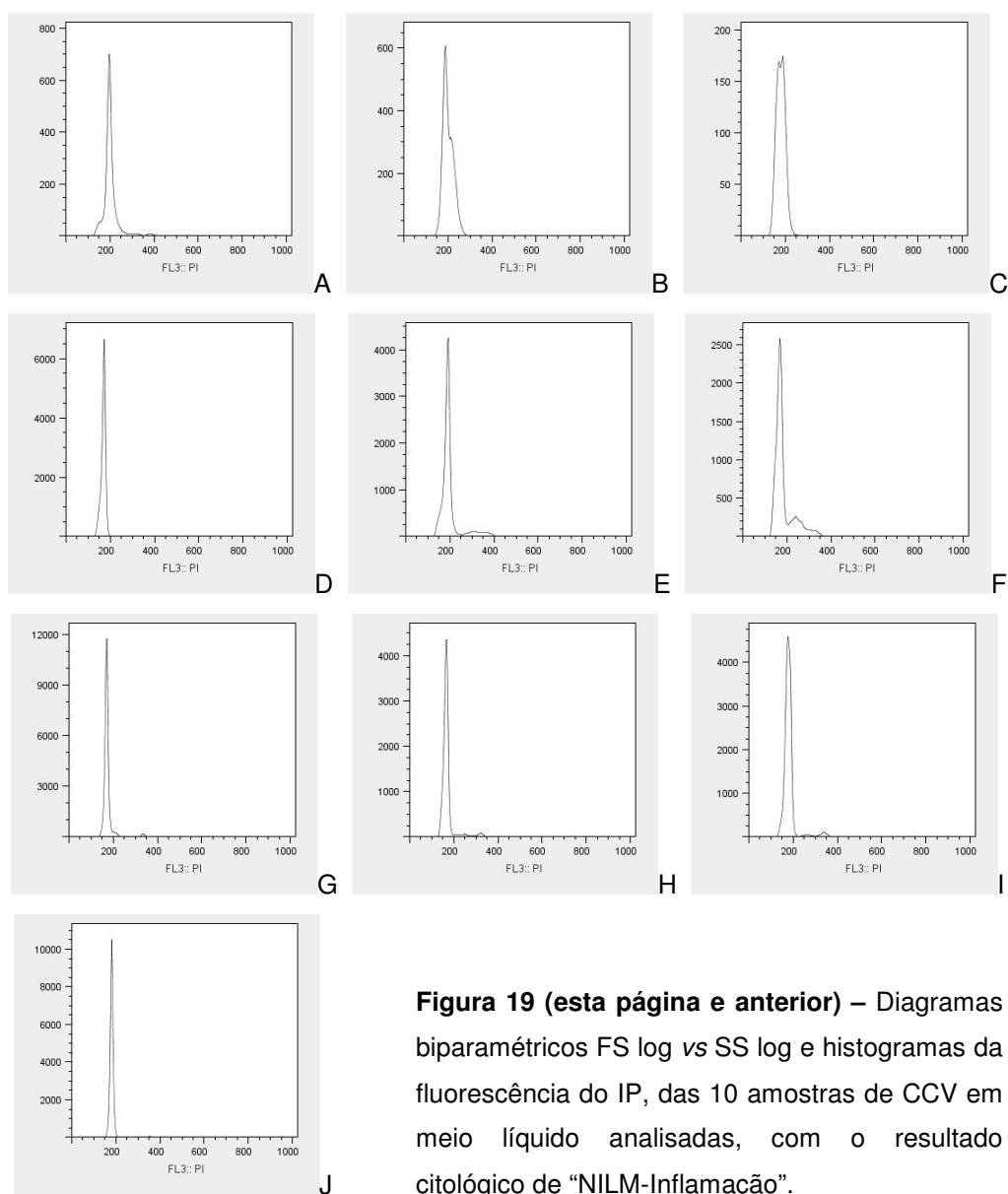


Figura 19

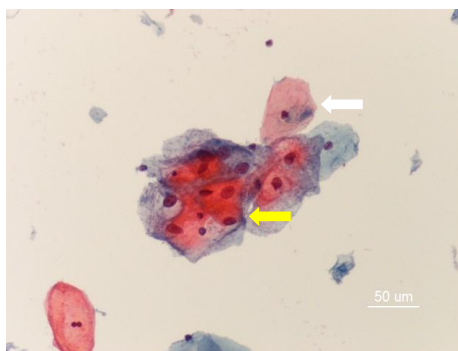
### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio



**Figura 19 (esta página e anterior)** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 10 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “NILM-Inflamação”.

### \* ASC-US

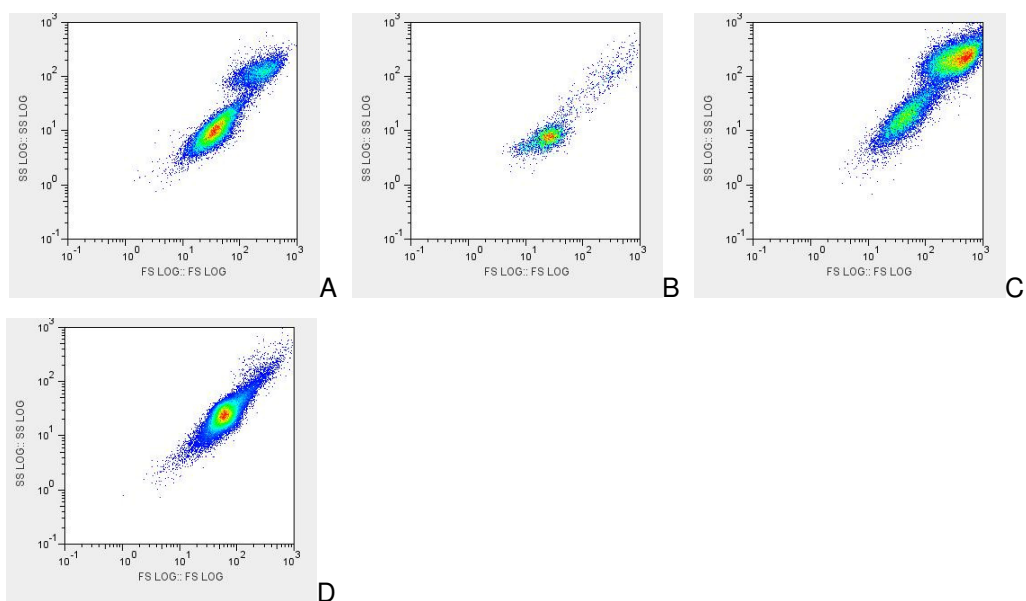
O resultado citológico de “ASC-US” (Figura 20) apresenta-se ao microscópio óptico com células epiteliais do tipo pavimentoso com aumento nuclear, ligeira irregularidade na distribuição da cromatina, ligeiro aumento da N/C e anomalias nucleares associadas a paraqueratose atípica.



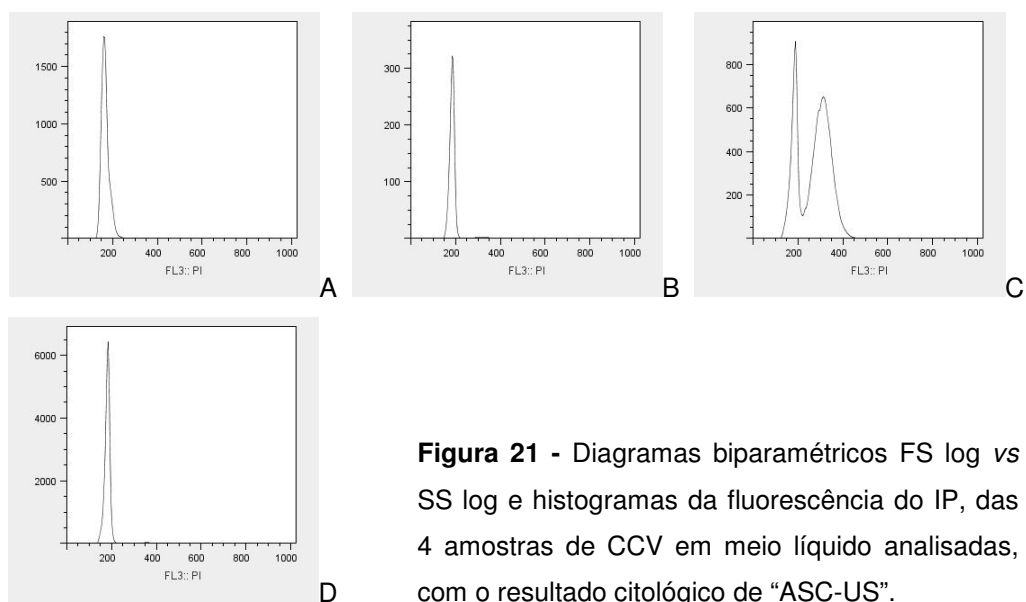
**Figura 20** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “NILM-Inflamação” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas normais (seta branca) e células pavimentosas atípicas com aumento nuclear, hiperchromasia nuclear e queratinização do citoplasma (seta amarela).

Foram estudadas por FCM, 4 amostras das quais se obtiveram os padrões representados na Figura 20. Os quatro citogramas obtidos apresentaram alguma heterogeneidade, mostrando duas amostras uma separação das duas subpopulações (Figura 21 – diagramas biparamétricos A e C) e em outras duas amostras predominou a subpopulação B (Figura 21 – diagramas biparamétricos B e D). A análise dos histogramas mostrou apenas um caso (C) com dois picos distintos: pico correspondente à subpopulação A com CV de 15,49 e mediana de 291,1 e pico da subpopulação B, com CV de 9,88 e mediana de 180,3. Nos restantes era visível apenas um pico bem definido correspondente, na sua maioria, a citomas da subpopulação B (Figura 21 – histogramas).

### Diagramas biparamétricos FS log vs SS log



### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio



**Figura 21** - Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 4 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “ASC-US”.

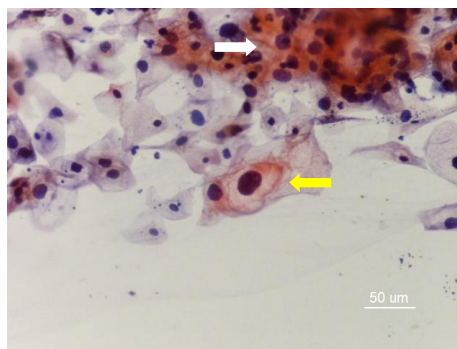


### \* LSIL

Na observação microscópica de CCV com o resultado citológico de “LSIL” (Figura 22) as células apresentam acentuado aumento nuclear, graus variáveis de hiperchromasia nuclear, bi e multinucleação, cromatina com distribuição uniforme mas grosseiramente granular e contorno nuclear ligeiramente irregular. A presença de coilócitos é frequente.

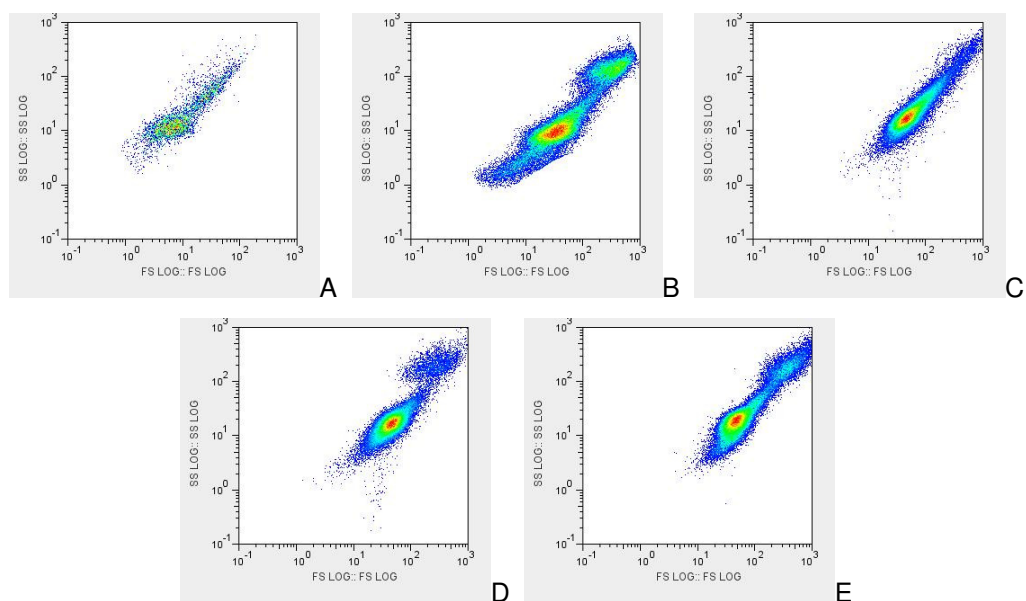
Na Figura 23 observam-se os resultados referentes à análise das 5 amostras de “LSIL”. Não foi possível salientar um perfil característico no que diz respeito aos diagramas biparamétricos: numa das amostras é imperceptível a existência de subpopulações (Figura 23 – diagrama biparamétrico A), em três é possível a distinção das subpopulações A e B (Figura 23 – diagrama biparamétrico B, D e E) e numa das amostras verifica-se um padrão de “arrasto”, em que parece predominar a subpopulação B (Figura 23 – diagrama biparamétrico C).

Os histogramas deste grupo citológico mostram amostras com apenas um pico bem definido (Figura 23 – histograma A) e outras contendo adicionalmente outro pequeno pico (Figura 23 – histograma B) ou, então, um arrasto de citomas para a direita (Figura 23 – histograma C, D e E).

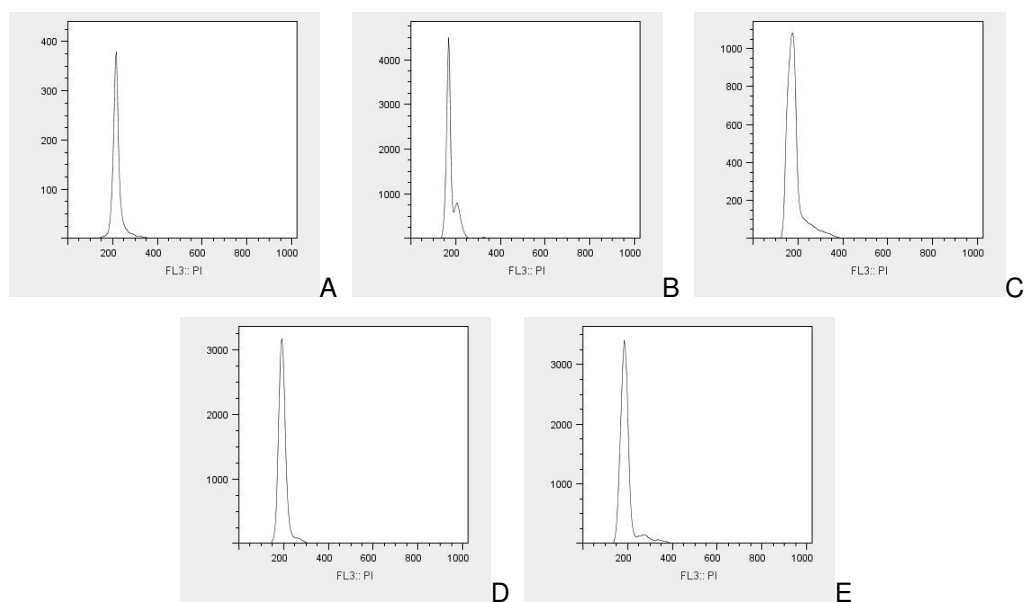


**Figura 22** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “LSIL” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas com acentuado aumento nuclear, aumento da N/C e hiperchromasia nuclear (seta branca) e um coilócito (seta amarela).

### Diagramas biparamétricos FS log vs SS log



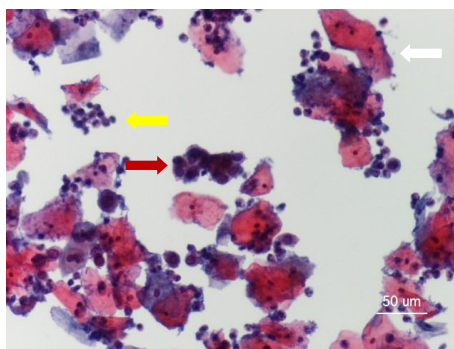
### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio



**Figura 23** - Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 5 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “LSIL”.

### \* HSIL

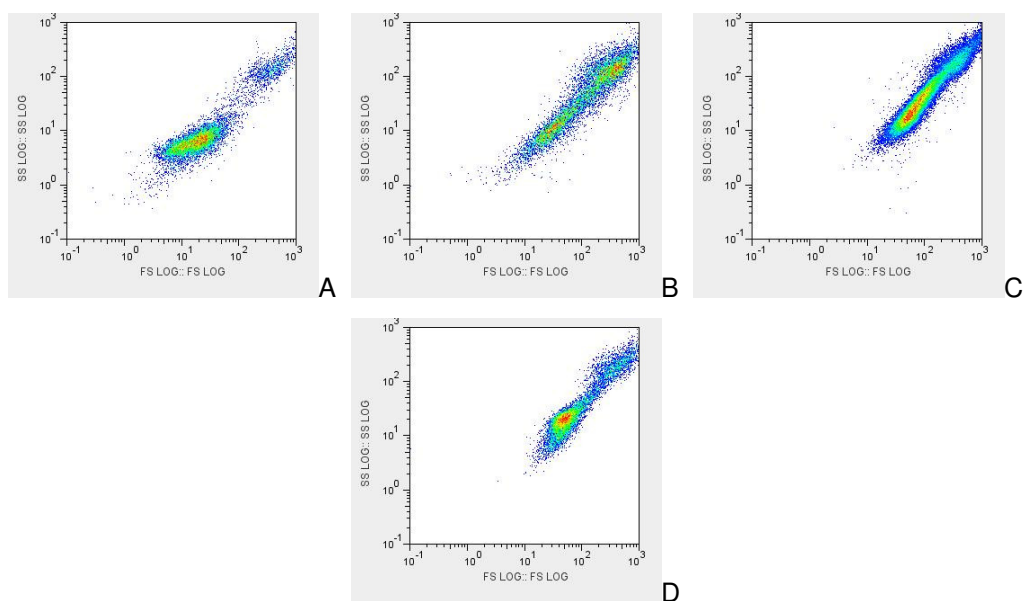
O grupo citológico “HSIL” (Figura 24) caracteriza-se citologicamente por ter células com acentuado aumento da N/C, devido ao aumento nuclear e perda de citoplasma. São também células com núcleos hipercromáticos, com irregularidades no contorno nuclear e cromatina uniformemente distribuída mas grosseiramente granular.



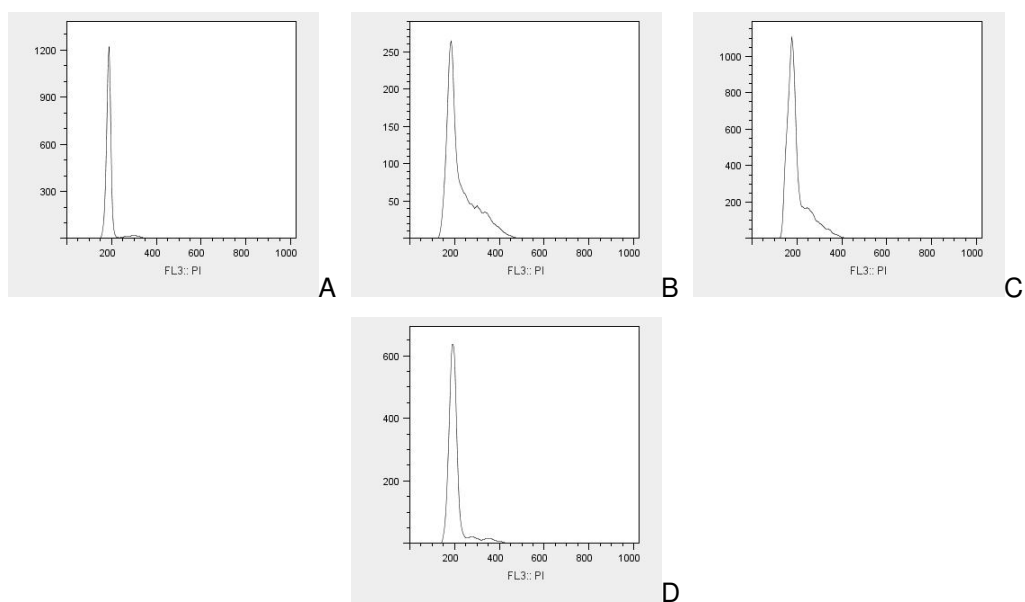
**Figura 24** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “HSIL” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas normais (seta branca), PMNs (seta amarela) e um grupo de células pavimentosas com acentuado aumento da N/C, perda de citoplasma, acentuada hipercromasia nuclear e membrana nuclear irregular (seta vermelha).

Deste grupo foram analisados quatro casos. A análise dos citogramas mostrou um perfil difuso da distribuição dos citomas, sem ser possível distinguir com clareza as subpopulações A e B, em três dos casos (Figura 25 – diagramas biparamétricos B, C e D). Na amostra A, contudo, essa distinção foi possível (Figura 25 – diagramas biparamétricos A). Ainda neste caso, na análise da fluorescência do IP foi possível observar dois picos (Figura 25 – histograma A), o maior com CV de 8,49 e mediana a 194,9 correspondente à subpopulação B (80,4%) e um pequeno, representativo da subpopulação A (5,85%) com CV de 16,5 e mediana no canal 347,2. Relativamente às restantes três amostras, estas apresentavam um pico maior pertencente à subpopulação B apresentando-se com um arrastamento para a direita (possível subpopulação A) (Figura 25 – histograma B, C e D).

### Diagramas biparamétricos FS log vs SS log



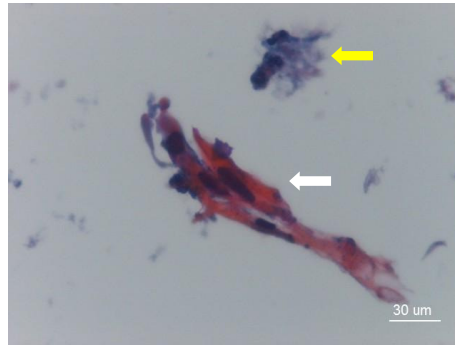
### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio



**Figura 25** - Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 4 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “HSIL”.

**\* Carcinoma epidermóide**

Neste grupo (Figura 26) apenas foi possível analisar dois casos. Este resultado citológico caracteriza-se pela presença maioritária de células isoladas, fusiformes, com acentuado pleomorfismo nuclear e celular, acentuada hipercromasia nuclear, com citoplasma oranjófilo e denso. O fundo apresenta frequentemente diátese tumoral.

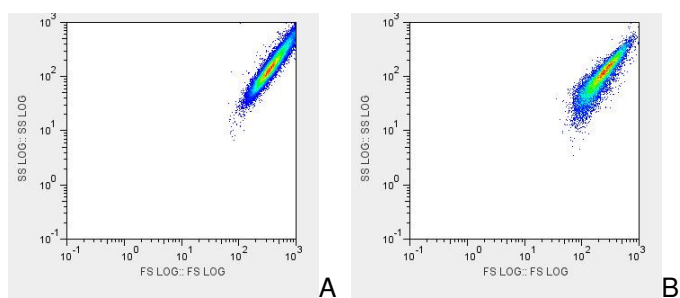


**Figura 26** – Imagem representativa de CCV em meio líquido, com resultado citológico de “Carcinoma epidermóide” (PAP). Na imagem observam-se células pavimentosas fusiformes, pleomórficas, com acentuada aumento e hipercromasia nuclear, com citoplasma denso e oranjófilo (seta branca). Observa-se também diátese tumoral (seta amarela).

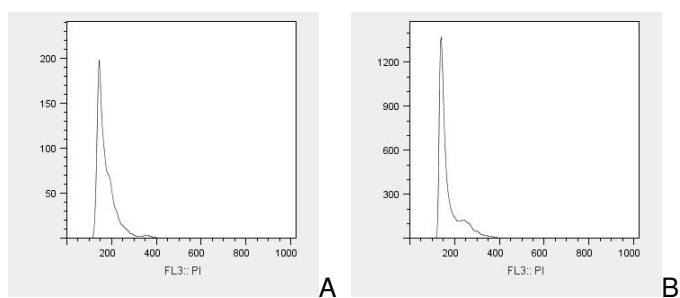
Ambos os citogramas obtidos, tal como em “NILM-Atrofia”, apresentaram um aspecto de arrastamento (Figura 27 – diagramas biparamétricos). No entanto, observou-se uma população menos dispersa, mais compacta e homogênea, e com maior FS e SS (quadrante superior direito).

Quanto à fluorescência do IP, os dois histogramas apresentaram um pico bem definido (mediana do caso A 119,8 e do caso B 124,2), com arrastamento de citomas à direita (Figura 27 – histogramas).

### Diagramas biparamétricos FS log vs SS log



### Histogramas da fluorescência do iodeto de propídio



**Figura 27** – Diagramas biparamétricos FS log vs SS log e histogramas da fluorescência do IP, das 2 amostras de CCV em meio líquido analisadas, com o resultado citológico de “Carcinoma epidermóide”.



---

## 4. DISCUSSÃO

---





A infecção por HPV de alto risco está associada ao desenvolvimento de cancro do colo do útero<sup>30</sup>. Os estudos epidemiológicos que conduziram à associação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de cancro do colo do útero contribuíram para uma melhor compreensão do processo oncogénico, uma melhor avaliação de risco em programas de rastreio e o desenvolvimento de estratégias de prevenção através da vacinação. A prevalência da infecção é elevada em mulheres jovens, sendo geralmente transitória<sup>31</sup>. Apenas uma pequena percentagem das mulheres infectadas por HPV de alto risco desenvolverá uma lesão neoplásica do colo uterino. Estes dados sugerem a existência de outros co-factores com um papel importante na carcinogénese do colo do útero mediada pelo HPV, como é o caso da contracepção hormonal, da inflamação crónica, do tabagismo, de factores imunológicos, entre outros<sup>9,11,13,14</sup>.

A CCV como método de eleição para o rastreio do cancro do colo do útero, apresenta uma sensibilidade que no máximo atinge os 84%<sup>21</sup>. Por outro lado, os testes moleculares, quando apresentam resultado positivo para HPV de alto risco, não determinam necessariamente o desenvolvimento para neoplasia.

Diversos estudos já demonstraram que a estimativa do conteúdo de DNA nuclear pode funcionar como um factor de prognóstico que permite a estimativa do risco relativo de progressão para lesões mais avançadas<sup>7,20,24-27,32-34</sup>. Desta forma, novas técnicas de análise podem ser admitidas, desde que preditivas, confiáveis e reprodutíveis.

Com base nos resultados obtidos foi possível inferir diversas considerações e levantar outras questões. Através da execução de consecutivas análises de um mesmo caso em diferentes períodos de tempo (diferentes períodos de duração da fixação), foi possível observar que os modelos de representações gráficas (FS log vs SS log e FL3:IP) se mantiveram ao longo do tempo. Num mínimo de 3 semanas após colheita/fixação até um máximo de 9 semanas, o número de subpopulações observadas e a sua distribuição mantiveram-se (análise pela dispersão da luz). Verificou-se um aumento da densidade dos aglomerados celulares, devido ao maior número de eventos analisados nalgumas das situações (e.g. Figura 15 – diagrama biparamétrico B 17.523 eventos e diagrama biparamétrico E 53.773 eventos). Podemos inferir que, pelo menos neste intervalo, o tempo de fixação com *Thinprep*<sup>®</sup> parece ter pouca influência na distribuição/fluorescência das subpopulações. Contudo, estes resultados deverão ser ainda comparados com material fresco e eventualmente com outros meios de preservação, para possível tratamento estatístico.

A variação do número de eventos analisados prendeu-se com o facto de um dos objectivos específicos ser a detecção de aneuploidias no conteúdo de DNA nuclear das células epiteliais do colo do útero. Os primeiros casos analisados rondaram o valor de 10.000 eventos (valor mínimo estipulado pelo *Cytometry Consensus Conference Guidelines*<sup>47</sup>). No entanto, nos primeiros ensaios verificou-se ser este um valor aparentemente insuficiente para a detecção de eventos raros (e.g. alterações no conteúdo de DNA). Deste modo, as células aneuplóides são eventos raros, ou seja, são poucas as células com ploidia de DNA diferente de 2N e 4N que podem auxiliar na detecção muito precoce de casos aneuplálicos. Assim, numa tentativa de aumentar a sensibilidade e representatividade de células com estas alterações, o valor total de eventos analisados foi aumentado para cerca de 50.000.

Contudo, o objectivo de detecção de alterações de ploidia em células epiteliais do colo do útero, através da marcação nuclear por IP, não foi possível concretizar (como é descrito mais à frente). Os estudos de Singh *et al*<sup>25</sup> já o demonstraram utilizando outros métodos de conservação das células; não utilizando a fixação directa e prolongada, como é o caso da CCV em meio líquido. Utilizaram material colhido para PBS refrigerado e armazenado a -20°C. A fixação foi curta, apenas de 30 minutos, a 4°C, em etanol, imediatamente antes da análise por FCM. Outros autores (Gonçalves *et al*<sup>33</sup>) mostraram a importância e viabilidade desta análise da ploidia do DNA nuclear, utilizando a citometria de imagem.

No presente estudo, e após a análise por dispersão de luz e marcação por IP, foi possível a observação de duas subpopulações. Impôs-se, desta forma, a necessidade de identificar o tipo celular correspondente a cada uma, para posteriormente ser possível a análise do conteúdo de DNA nuclear, apenas das células epiteliais do colo do útero. Para distinção entre células não leucocitárias (células epiteliais) e células leucocitárias (onde predominam os PMNs na CCV), utilizou-se a marcação pelo Ac CD45, específico deste último grupo celular. Por analogia com o estudo de Grundhoefer e Patterson<sup>8</sup>, e Kottaridi *et al*<sup>43</sup>, era de esperar que a subpopulação A (com maior FS e SS) correspondesse aos PMNs e a subpopulação B (menor FS e SS) a células epiteliais. Não esquecer de referir que os autores destes estudos utilizaram marcação por outros Ac (CAM 5.2 e CD16), mas que não foi possível a sua aplicação neste estudo, pois a sua marcação simultânea não foi viável no citómetro de fluxo que estava disponível.

Neste trabalho, os resultados obtidos pela marcação por CD45, levantaram fortes questões quanto à sua interpretação. À partida, pode-se assumir a marcação da subpopulação A como positiva (e forte). Quanto à marcação da subpopulação B põem-se

diversas interrogações. Será esta marcação negativa? Será positiva mas com fraca marcação para o Ac CD45? Será esta marcação provocada por artefactos, nomeadamente da fixação prolongada, da autofluorescência ou de marcações inespecíficas?

Assim, através da aplicação do FACS e fazendo a separação destas duas subpopulações, baseada em diferentes FS e SS, procurou-se caracterizar as subpopulações identificadas em FCM. Nestas análises, a observação por MO dos eventos separados, para diferentes tubos colectores, mostrou que, em ambas as subpopulações, existiam células epiteliais do tipo pavimentoso. Não se dispõe, neste momento, de explicação para o facto, estando em curso o estudo de mais casos/metodologias no sentido de compreender estas discrepâncias.

Ainda no decorrer da metodologia apresentada procedeu-se, aquando da análise segundo marcação por CD45 e IP, à observação em MF destas preparações. Foi possível a visualização da marcação do DNA nuclear feita pelo IP, tanto nas células epiteliais como nos PMNs, no entanto, não se observou fluorescência CD45-FITC nas células leucocitárias. Tal facto pode ser justificado por este soro ser específico para FCM e a baixa fluorescência não ser detectável por MF. Pode, também, contribuir para esta baixa intensidade de fluorescência o facto de os casos da amostragem serem fixados. A fixação previne a autólise por inibição das enzimas dos lisossomas e inibe o crescimento de fungos e bactérias que podem promover reacções de degradação celular. Os fixadores desnaturam as proteínas por coagulação e/ou formação de compostos adicionados, nomeadamente quelantes de cálcio. Assim, existe consequentemente uma alteração na conformação das proteínas que resulta na inactivação das enzimas, deferindo os compostos resultantes da fixação, relativamente aos compostos iniciais, nos aspectos químicos e antigénicos. Estas alterações podem ser de tal maneira extensas que levam ao não reconhecimento do antígeno por parte do seu anticorpo específico (receptor antigénico mascarado), sendo necessário recorrer a processos de recuperação antigénica<sup>48</sup>. Pode, também, ter contribuído para tal, o facto de a fixação em meio líquido ter sido feita no fixador *PreservCyt* (*Thinprep*®). Como descreve Grundhoefer e Patterson<sup>8</sup>, a intensidade de fluorescência varia significativamente consoante o método de preservação utilizado. No seu estudo comparativo entre diferentes meios de preservação de citologia líquida, a solução de *Cytorich* foi a que apresentou melhores resultados em termos de preservação antigénica, enquanto a solução de *PreservCyt* foi a pior classificada<sup>8</sup>.

Procurou-se fazer uma análise qualitativa, com vista à correlação dos diferentes perfis da CCV, obtidos pela análise por FCM com os diferentes diagnósticos citológicos pré-atribuídos, segundo classificação de Bethesda 2001. Analisando cada um dos 7 grupos citológicos observou-se, como era de esperar dada a heterogeneidade citológica, inter e intra grupos, uma heterogeneidade nos citogramas/histogramas obtidos por FCM. De salientar que esta heterogeneidade citológica é dependente de factores fisiológicos da mulher, nomeadamente a fase do ciclo menstrual em que a colheita é feita, a idade, factores hormonais exógenos, etc.

Na generalidade dos grupos, e com excepção do “NILM-Atrofia” e do “Carcinoma epidermóide”, a maioria dos casos apresentou duas subpopulações distintas, uma com maior FS e SS (subpopulação A) e outra com menor FS e SS (subpopulação B), não sendo possível a sua identificação citológica pelo atrás exposto. Saliente-se que no grupo “NILM” apenas uma amostra (F) apresentou uma distribuição diferente das restantes observadas neste resultado citológico, no diagrama biparamétrico FS log vs SS log. Na visualização deste caso F, por MO, verificou-se a presença de fenómenos de citólise. A citólise atinge particularmente as células pavimentosas intermediárias, sendo o resultado da digestão do glicogénio pelos bacilos de Doederlein. As citologias caracterizam-se pela presença de numerosos núcleos nus e detritos celulares<sup>28,49</sup>. Pode ser esta uma possível justificação para a diferente distribuição observada neste caso.

Nos dois resultados citológicos de “NILM-Atrofia” e de “Carcinoma epidermóide” o perfil FS log vs SS log é semelhante, sendo apenas identificada uma subpopulação “alongada”, com aspecto de “arrasto”; sendo maior, mais dispersa e com maiores variações FS log e SS log em “NILM-Atrofia” que em “Carcinoma epidermóide”. Neste último verifica-se uma subpopulação mais pequena e com maior FS log e SS log.

Relativamente ao conteúdo de DNA nuclear, com excepção do resultado “NILM-Atrofia” e “Ca epidermóide” (nos quais não foi possível separação/distinção de subpopulações), na restante maioria dos casos, os histogramas FL3:IP apresentavam distintos posicionamentos da mediana: a subpopulação A de padrão irregular com um pico em canal variável, tinha a sua mediana entre o canal 200 e 400, apresentando-se com elevado e variado CV (entre 12,84 e 42,87); enquanto a subpopulação B apresentava o padrão típico do ciclo celular de uma célula normal, ou seja, pico G0/G1 (correspondente a 2N) próximo do canal 200; e o pico G2 (correspondente a 4N) no canal com o dobro do valor. Quanto à distribuição do conteúdo de DNA nuclear encontrado nos casos estudados de “NILM-Atrofia” e “Ca epidermóide”, a sua maioria apresentou uma distribuição irregular e heterogénea, com elevados CV (e.g. amostra A de “Ca

epidermóide” CV=33), com presença de citomas desde o canal 100 ao canal 600 e mediana abaixo do observado nos restantes casos: em “NILM-Atrofia” média das medianas = 170,66 e em “Ca epidermóide” = 121,98.

O perfil de “arrasto” observado em “NILM-Atrofia” tem causa provável na variação celular tanto a nível de tamanho como de complexidade que se encontra neste tipo de resultado. A atrofia do epitélio do colo do útero é provocada pela ausência/cessação da secreção da hormona esteróide estrogénio. A sua falta provoca a ausência de estímulo para proliferação celular e maturação do epitélio cervico-vaginal. Observa-se assim, a substituição das células pavimentosas superficiais e intermediárias por células pavimentosas parabasais, indicando a diminuição da actividade hormonal. A diminuição da secreção de muco, provoca a dessecação das mucosas que se manifesta nas citologias por um aumento do tamanho das células parabasais que mostram núcleos volumosos e pálidos. Observa-se, também, eosinofilia citoplasmática, fenómenos de picnose, cariorrexis e variação de tamanho e de forma das células. A atrofia mucosa profunda favorece o aparecimento de uma vaginite caracterizada por modificações inflamatórias e pronunciadas atipias nucleares e citoplasmáticas<sup>28,49</sup>. Estes fenómenos fazem com que se observem células e detritos celulares muito variados em forma, tamanho e conteúdo de DNA nuclear, justificando o aspecto de “arrasto” observado nos diagramas FS log vs SS log e a heterogeneidade dos diagramas de marcação por IP. De referir que os casos de atrofia analisados pertenciam todos a estados de menopausa, no entanto, estas características atróficas não lhe são exclusivas. Na infância e no período pós-parto também se verifica ausência/cessação da actividade hormonal esteróide logo, estas características citológicas também lhe são típicas<sup>28,49</sup>.

Assim e segundo uma análise qualitativa, da CCV em meio líquido por FCM, foi possível a identificação de um perfil característico do resultado citológico “NILM-Atrofia”, correlacionando o diagrama da dispersão da luz e da marcação por IP, permitindo, desta forma, uma rápida identificação de possíveis estados atróficos.

Em suma, a FCM mostrou conseguir, de forma rápida, separar subpopulações existentes em cada CCV, embora a possibilidade de se poder correlacionar estes dados com os respectivos resultados citológicos, careça ainda de confirmação, o que se pode afigurar complexo dada a reconhecida heterogeneidade celular que pode existir dentro de um mesmo resultado citológico (segundo classificação de Bethesda 2001).

Relativamente ao efeito do tempo de preservação/fixação, foi feita uma análise de um mesmo caso em diferentes períodos de tempo de fixação (3 a 9 semanas de fixação),

que demonstrou não existirem alterações de nota, para o meio de preservação usado, do diagrama de dispersão de luz nem do conteúdo de DNA nuclear segundo marcação por IP, ao longo deste período. Contudo, novos ensaios comparando material a fresco e outros meios de preservação devem ser realizados, para possível comparação estatística.

Com a metodologia executada, não foi possível ainda otimizar um protocolo que permitisse a análise quantitativa do conteúdo de DNA nuclear das células epiteliais do colo do útero, com vista à detecção de aneuploidias, tendo em conta a sua importância como meio complementar ao rastreio do carcinoma cervical, uma vez que a identificação citológica das duas subpopulações encontradas na análise por FCM de CCV em meio líquido, não foi exacta. Todavia, a detecção de pequenos desvios no posicionamento dos picos nas amostras, pode evidenciar, se eliminados factores técnicos, potenciais alterações no conteúdo em DNA.

---

## **5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---





O interesse e a necessidade crescente de novas tecnologias e de melhores, mais eficientes e eficazes meios de diagnóstico com interesse em saúde pública, têm levado a uma grande aposta nesta área de estudo e a um substancial aumento dos seus conhecimentos.

A técnica de rastreio do cancro do colo do útero, por *screening* da CCV, apresenta um índice de sensibilidade que idealmente deveria ser maior do que aquele que é verificado (cerca de 75% na citologia convencional e cerca de 84% na citologia em meio líquido). O teste de rastreio ideal deverá ter, para além de uma elevada sensibilidade, um elevado valor preditivo positivo e seleccionar exclusivamente as mulheres com doença significativa (CIN II – III ou cancro) ou com potencial evolutivo.

Em conclusão, e face aos objectivos definidos, apesar das diversas questões que ficaram por esclarecer, o trabalho até agora elaborado foi muito positivo em vários aspectos. Tornou-se possível desenvolver novas competências, tanto cognitivas como técnicas, nomeadamente na utilização de ferramentas como a MF, FCM e o FACS. A utilização destas técnicas e a aplicação da metodologia descrita, permitiram adquirir prática no manuseamento/preparação de amostras para a sua utilização nestas ferramentas.

Com esta metodologia, conheceu-se o comportamento da CCV, preservada em meio líquido *PreservCyt* (*Thinprep*®) na análise por FCM, em que na maioria dos casos predominou a ocorrência de duas subpopulações, que foi possível descrever segundo dispersão de luz (FS vs SS) e conteúdo de DNA nuclear. Saliente-se que os grupos citológicos de “NILM-Atrofia” e “Ca epidermóide” apresentaram um perfil de “arrasto” característico (com algumas diferenças, descritas nos Resultados). Quanto ao grupo do “Ca epidermóide” foi apenas possível analisar dois casos, mas visto terem sido estudadas 16 amostras de “NILM-Atrofia”, pode-se dizer que este perfil específico poderá ser útil para uma rápida e possível identificação de casos atróficos.

Como já foi dito, e apesar de os resultados finais não serem ainda conclusivos, a aplicação da marcação pelo Ac CD45 e utilização de FACS foram úteis no conhecimento destas técnicas e da sua grande potencialidade como técnicas complementares de diagnóstico.

Não tendo sido possível a correcta identificação citológica de cada uma das subpopulações encontradas, não foi viável executar uma avaliação concreta das possíveis alterações na ploidia das células epiteliais do colo do útero.

Do estudo dos diferentes citogramas e histogramas obtidos da análise de um mesmo caso, após diferentes períodos de fixação (de 3 a 9 semanas), permitiu concluir que não se observam alterações significativas no comportamento da CCV em FCM ao longo do tempo. É, contudo, necessário complementar esta conclusão com estudos de material fresco e, se possível, com outros fixadores.

Este estudo preliminar permitiu, sobretudo, testar diferentes formas de abordar o problema e através dos seus resultados foi possível tirar orientações sobre novas metodologias a aplicar e possíveis erros técnicos que podem surgir e de que forma podem ser evitados.

Assim, dado o facto deste trabalho ser pioneiro na abordagem da CCV em meio líquido (*PreservCyt*) através da FCM, as dificuldades e adversidades foram numerosas. Futuramente e de modo a complementar os resultados obtidos e a esclarecer as questões levantadas novos ensaios devem ser feitos.

Primeiro torna-se imperativo a identificação correcta e fidedigna do tipo celular pertencente a cada uma das subpopulações. Deverão ser feitos estudos comparativos entre material fixado vs material a fresco, utilizando diferentes meios de preservação/fixação (ex: *PreservCyt* vs *Cytotrich*). Verificar, assim, a influência da fixação sobre as células da CCV e através da marcação por anticorpos, nomeadamente o CD45, averiguar de que forma os diferentes fixadores influenciam a preservação antigénica. Seleccionado o melhor meio líquido de fixação/preservação antigénica de CCV, torna-se pertinente aplicar novamente a metodologia seguida neste trabalho – análise por dispersão de luz, marcação por CD45, marcação por IP (em FCM) e comprovação da identidade das subpopulações por FACS.

Após a selecção do melhor fixador e caso este não seja o *PreservCyt*, pode novamente ser testada a visualização da fluorescência do CD45-FITC (BD Biosciences, S. Jose, CA) por MF. Caso a não observação se mantenha, será interessante explorar as potencialidades de protocolos de recuperação antigénica para verificar se mesmo este sendo um soro comercializado como específico para FCM, é possível a sua utilização em MF.

A aplicação dos mesmos anticorpos usados por Grundhoefer e Patterson<sup>8</sup>, e Kottaridi *et al*<sup>43</sup> (CAM 5.2 e CD16) deve, também, ser ponderada, recorrendo a citómetros adequados, para ultrapassar dificuldades de natureza técnica.

Novos estudos podem, também, fazer a aplicação de outros fluorocromos para marcação do DNA, nomeadamente a utilização do SYBR® Green I. Este fluorocromo pode permitir obter CV menores, apresentando ainda elevada sensibilidade e selectividade para a detecção de DNA de cadeia dupla.

Relativamente ao estudo dos perfis da CCV por FCM e tendo-se definido um perfil específico para a possível rápida identificação de padrões atróficos, utilizando esta técnica simples e objectiva, futuros trabalhos poderão ser desenvolvidos no sentido de aumentar o número de casos analisados, nomeadamente aqueles com processos lesionais – ASC-US, LSIL, HSIL e carcinoma epidermóide, e, ainda, visto terem sido analisados apenas estados de menopausa referentes ao resultado citológico de “NILM-Atrofia”, seria interessante verificar a sua aplicabilidade em “NILM-Atrofia pós-parto” e em casos com processo lesional/dislásico. Quanto à descrição morfológica e interpretação segundo Bethesda 2001, esta pode vir a ser feita por mais do que um observador especializado.

Neste trabalho, por não ter sido possível identificar de forma segura o tipo celular de cada uma das subpopulações encontradas por FCM, foi inviável a optimização de um protocolo que permitisse identificar aneuploidias neste tipo de citologia (CCV em meio líquido *PreservCyt*), continuando a ser um desafio a conquistar. Em futuros trabalhos, possivelmente através de outra abordagem, a detecção de aneuploidias deverá mostrar-se uma ferramenta adjuvante de extrema importância (já demonstrada noutros tipos de material e/ou noutros métodos de preservação celular) para o prognóstico e seguimento de lesões cervico-vaginais.

Todo e qualquer estudo que procure explorar as potencialidades da FCM na análise da CCV em meio líquido, é aceitável e potencialmente promissor, visto esta ser uma área pouco estudada e ainda sem aplicação prática até hoje, em Portugal.



---

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



1. Macedo A, Andrade S, Moital I, Moreira A, Pimentel FL, Barroso S, *et al.* Perfil da doença oncológica em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*. 2008; 21: 329-34.
2. Morgado A, Félix A, Francisca A, Matos A, Alves A, Azinhais A, *et al.* Cancro ginecológico – Reunião do consenso nacional. Coimbra: Sociedade Portuguesa de Ginecologia Oncológica; Sociedade Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico Vulvo Vaginal; Sociedade Portuguesa de Ginecologia; 2007.
3. International Agency for Research on Câncer. Lyon: IARC; 2008- [sem data da última actualização, acesso em 29 de Março 2009]. Disponível em: [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)
4. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Annals of Oncology*. 2005; 16: 481-8.
5. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*. 2007; 18: 581-92.
6. Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, *et al.* Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95: 46-52.
7. Melsheimer P, Klaes R, Doeberitz MVK, Bastert G. Prospective clinical study comparing DNA flow cytometry and HPV typing as predictive tests for persistence and progression of CIN I/II. *Cytometry*. 2001; 46: 166-71.
8. Grundhoefer D, Patterson B. Determination of liquid-based cervical cytology specimen adequacy using cellular light scatter and flow cytometry. *Cytometry*. 2001; 46: 340-4.
9. Pereira A, Henriques A, Matos A, Oliveira CF, Silva DP, Solheiro H, *et al.* Vacina contra o HPV – Reunião de consenso nacional. Coimbra: Sociedade Portuguesa de Ginecologia; 2007.
10. Ramada D, Medeiros R. HPV e cancro do colo do útero: intervenção urgente. *Onco.news*. 2007; 2: 4.
11. Sociedade Portuguesa de Papillomavírus. Loures: Sociedade Portuguesa de Papillomavírus; 2004- [actualizada em 22 Dezembro 2008; acesso em 7 Janeiro 2009]. Disponível em: <http://www.sppv.org>
12. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003; 16 (1): 1-17.
13. Camara G, Cruz M, Veras V, Martins C. Os papilomavírus humanos – HPV: carcinogénese e imunogénese. *Universitas Ciências da Saúde*. 2002; 1 (1): 159-68.
14. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet*. 2004; 85 (3): 301-8.



15. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001; 164 (7): 1017-25.
16. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006; 110: 525-41.
17. Silva ASB. Factores virais e do hospedeiro envolvidos na infecção por HPV [dissertação de Mestrado]. Aveiro: Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro; 2008.
18. Passa a palavra. Lisboa: Liga Portuguesa contra o Cancro. [sem data da última actualização; acesso em 17 Janeiro 2009]. Disponível em: [www.passaapalavra.com](http://www.passaapalavra.com)
19. Silva DP, Moutinho JMC. Consenso em patologia cervico-vulvovaginal. Póvoa de Varzim: Sociedade Portuguesa de Ginecologia; Secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-Vulvovaginal; 2004.
20. Scheurer ME, Guillaud M, Tortolero-Luna G, McAulay C, Follen M, Adler-Storthz K. Human papillomavirus-related cellular changes measured by cytometric analysis of DNA ploidy and chromatin texture. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2007; 72B: 324-31.
21. Thinprep Pap Test Homepage. Marlborough: Hologic, Inc; 2008- [sem data da última actualização; acesso em 7 Janeiro 2009]. Disponível em: [www.thinprep.com](http://www.thinprep.com)
22. Solomon D, Nayar R. The Bethesda system for reporting cervical cytology. Second ed. New York: Springer; 2004.
23. Sociedade Portuguesa de Citologia. Porto: Sociedade Portuguesa de Citologia. [sem data da última actualização, acesso em 10 de Maio 2009]. Disponível em: [www.spcitologia.org](http://www.spcitologia.org)
24. Bollmann R, Méhes G, Torka R, Speich N, Schmitt C, Bollmann M. Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. *Cancer Cytopathol*. 2003; 99 (1): 57-62.
25. Singh M, Mehrotra S, Kalra N, Singh U, Shukla Y. Correlation of DNA ploidy with progression of cervical cancer. *J Cancer Epidemiol*. 2008; 2008: 7 pages.
26. Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G, Doeberitz MVK. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 3059-63.
27. Vermeulen CFW, Jordanova ES, Szuhai K, Kolkman-Uljee S, Vrede MA, Peters AAW, *et al*. Physical status of multiple human papillomavirus genotypes in flow-sorted cervical cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007; 175: 132-7.
28. Prey M, Abdul-Karim F. Gynecologic cytopathology. In: Atkinson BF. Atlas of diagnostic cytopathology. 2ª ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 31-103.

29. Longworth M, Laimins L. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 362-72.
30. Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 342-50.
31. Kirwan J, Herrington C. Human papillomavirus and cervical cancer: where are we now? *Br J Obstet Gynaecol.* 2001; 108: 1204-13.
32. Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, Dalstein V, Joseph K, Bellefquih S, *et al.* Contribution of DNA ploidy image cytometry to the management of ASC cervical lesions. *Cancer Cytopathol.* 2008; 114 (4): 263-9.
33. Gonçalves S, Haas P, Spada C, Fontana CS, Rangel L, Mendonça MAC, *et al.* Citometria de imagem do conteúdo de DNA nuclear de células epiteliais do colo uterino. *RBAC.* 2007; 39 (1): 71-8.
34. Lage J, Weinberg DS, Huettnner PC, Mark SD. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors: association of ploidy with tumor type, histologic grade and clinical stage. *Cancer.* 1992, 69: 2668-75.
35. Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo – funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia.* 2004, 78: 32-40.
36. Loureiro J, Santos C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia.* 2004, 77; 18-29.
37. Côrte-Real M, Sansonetty F, Ludovico P, Prudêncio C, Rodrigues F, Fortuna M, *et al.* Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia.* 2002, 71; 19-33.
38. Loureiro JCM. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. [Dissertação de Doutoramento]. Aveiro: Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro; 2007.
39. Wulff S. Flow cytometry – Educational guide. 2<sup>a</sup> ed. USA: Dako; 2006.
40. Orfao A, Buitrago JMC, Pizarro CJ, Fernández AL. La citometria de flujo en el laboratorio clínico. Madrid: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 1995.
41. Health in the XXI Century: a vision from the European Youth. Lisboa: Ciência Viva, c1996-2009 [sem data da última actualização; acesso em 13 Junho 2009]. Sansonetty F. O Cancro como Doença Celular: Contributos da Citologia Analítica para a Medicina da Célula Cancerosa. Disponível em: [http://www.cienciaviva.pt/healthXXI/topics.asp?lang=pt&acao=ipatimup5\\_doc\\_pt](http://www.cienciaviva.pt/healthXXI/topics.asp?lang=pt&acao=ipatimup5_doc_pt)
42. Kashyap V, Das BC. DNA aneuploidy and infection of human papillomavirus type 16 in preneoplastic lesions of the uterine cervix: correlation with progression to malignancy. *Cancer Letters.* 1998; 123 (1): 47-52.

- 43.** Kottaridi C, Georgoulakis J, Kassanos D, Pappas A, Spathis A, Margari N, *et al.* Use of flow cytometry as a quality control device for liquid-based cervical cytology specimens. *Cytometry. In press* 2009.
- 44.** Barret D, Jensen RH, King EB, Dean PN, Mayall BH. Flow cytometry of human gynecologic specimens using log chromomycin A3 fluorescence and log 90° light scatter. *J Histochem Cytochem.* 1979; 27 (1): 573-8.
- 45.** Puntoni M, Zanardi S, Branchi D, Bruno S, Curotto A, Varaldo M, *et al.* Prognostic effect of DNA aneuploidy from bladder washings in superficial bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16 (5): 979-83.
- 46.** BD FACS Aria Cell-Sorting System. Franklin Lakes: BD Biosciences, 2009 [sem data da última actualização, acesso em 13 de Junho 2009] Disponível em: [www.bdbiosciences.com/features/products/display\\_product.php?keyID=53](http://www.bdbiosciences.com/features/products/display_product.php?keyID=53)
- 47.** Rabinovitch PS. DNA content histogram and cell cycle analysis. *Methods Cell Biol.* 1994; 41: 263-96.
- 48.** Borges-Ferro, A. Técnicas imunocitoquímicas. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. [actualizada em 25 Maio 2008; acesso em 23 Maio 2009]. Disponível em: <http://www.amadeuferro.pt.vu/>
- 49.** Boon ME, Gray W. Normal vulva, vagina and cervix: hormonal and inflammatory conditions. In: Gray W, McKee GT. *Diagnostic cytopathology.* London: Churchill Livingstone; 2003. p. 651-776.

---

## 7. ANEXOS

---



## Anexo 1

Listagem de casos analisados, com respectiva idade das utentes, resultado citológico e descrição morfológica

Legenda:

**ASC-US:** Células pavimentosas atípicas de significado indeterminado

**Ca:** Carcinoma

**Céls:** Células

**Det:** Detritos

**Gland:** Glandulares

**HSIL:** Lesão intraepitelial de alto grau

**LSIL:** Lesão intraepitelial de baixo grau

**NILM:** Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade

**Pav:** Pavimentosas

**PQ:** Paraqueratose

**+:** pouco

**++:** moderado

**+++:** muito

Nº de casos		Idade	Resultado citológico	Descrição morfológica
1	A	20	NILM	Céls pav e gland, +PMN
2	B	-	NILM	Céls pav, + PMN
3	C	50	NILM	Céls pav e gland, PQ
4	D	46	NILM	Céls pav e gland
5	E	25	NILM	Céls pav e gland
6	F	30	NILM	Céls pav e gland, ++ citólise
7	G	36	NILM	Céls pav e gland, + det celulares
8	H	-	NILM	Céls pav e gland, + PMN
9	I	32	NILM	Céls pav e gland
10	J	32	NILM	Céls pav e gland
11	K	-	NILM	Céls pav e gland, + det celulares
12	L	-	NILM	Céls pav e gland
13	M	42	NILM	Céls pav e gland, PQ acentuada
14	A	-	NILM - Atrofia	Céls parabasais, ++ det celulares
15	B	60	NILM - Atrofia	Céls parabasais, +++ det celulares
16	C	53	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, ++ det celulares
17	D	72	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, + det celulares, ++ PMN
18	E	58	NILM - Atrofia	Céls parabasais, ++ det celulares
19	F	79	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, +++ det celulares
20	G	44	NILM - Atrofia	Céls pav, céls parabasais
21	H	65	NILM - Atrofia	Céls parabasais, ++ det celulares
22	I	49	NILM - Atrofia	Céls parabasais, ++ det celulares

23	J	83	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, ++ det celulares
24	K	57	NILM – Atrofia com inflamação	Céls pav e parabasais, +++ PMN
25	L	59	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, ++ det celulares
26	M	64	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, ++ det celulares
27	N	-	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, ++ det celulares, ++ PMN
28	O	-	NILM – Atrofia com inflamação	Céls pav e parabasais, +++ PMN
29	P	46	NILM - Atrofia	Céls pav e parabasais, +++ PMN
30	A	50	Inflamação	Céls pav e gland, ++ PMN
31	B	48	Inflamação	Céls pav e gland, +++ PMN
32	C	37	Inflamação	Céls pav e gland, +++ PMN
33	D	31	Inflamação	Céls pav e gland, +++ PMN
34	E	32	Inflamação	Céls pav e metaplásicas, +++ PMN
35	F	26	Inflamação	Céls pav e gland, ++ PMN
36	G	33	Inflamação	Céls pav e gland, +++ PMN
37	H	33	Inflamação	Céls pav e gland, +++ PMN
38	I	37	Inflamação	Céls pav e gland, ++ PMN
39	J	42	Inflamação	Céls pav e gland, ++ PMN
40	A	50	ASC-US	Céls pav, gland e metaplásicas, ++ PMN, PQ atípica acentuada
41	B	26	ASC-US	Céls pav (com alterações) e gland, ++ det celulares, ++ PMN
42	C	42	ASC-US	Céls pav e gland, PQ atípica acentuada
43	D	46	ASC-US	Céls pav (com alterações) e metaplásicas, +++ PMN
44	A	32	LSIL	Céls pav (com alterações) e gland, ++ det celulares, + PMN
45	B	23	LSIL	Céls pav (com alterações), + det celulares, fundo limpo
46	C	29	LSIL	Céls pav (com alterações) e gland, +++ det celulares, ++ PMN
47	D	37	LSIL	Céls pav (com alterações), ++ PMN
48	E	29	LSIL	Céls pav (com alterações) e gland
49	A	34	HSIL	Céls pav (com alterações), +++ PMN, +++ det celulares
50	B	37	HSIL	Céls pav (com alterações), + PMN, + det celulares, tricomonas
51	C	34	HSIL	Céls pav (com alterações), +++ PMN, +++ det celulares, cândida
52	D	45	HSIL	Céls pav (com alterações), ++ PMN, ++ det celulares
53	A	69	Ca epidermóide	Céls pav (com alterações), sangue, diátese tumoral
54	B	-	Ca epidermóide	Céls pav (com alterações), diátese tumoral